



Utilidad pronóstica de la Citometría de Flujo en líquido cefalorraquídeo al diagnóstico, en adultos con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Instituto Nacional de Cancerología entre 2013 y 2018

**Maira Nataly Enríquez Ruano
Pilar Enríquez Ruano**

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia
2020

Utilidad pronóstica de la Citometría de Flujo en líquido cefalorraquídeo al diagnóstico, en adultos con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Instituto Nacional de Cancerología entre 2013 y 2018

Maira Nataly Enríquez Ruano
Pilar Enríquez Ruano

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Especialista en Medicina Interna

Especialista en Neurología

Directora:

Myriam Saavedra Estupiñán

Médica, Neuróloga

Profesora Titular de Neurología Clínica

Coinvestigador:

Leonardo José Enciso Olivera

Internista, Hematólogo

Instituto Nacional de Cancerología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina Interna

Bogotá D.C, Colombia

2020

*A todos los pacientes que diariamente luchan
una batalla contra el cáncer*

Agradecimientos

Al Doctor Leonardo José Enciso Olivera, hematólogo del Instituto Nacional de Cancerología por el apoyo y aportes para la construcción y desarrollo de esta idea de investigación.

A la Doctora Miriam Saavedra Estupiñán Profesora titular de Neurología y Jaiver Macea Ortiz, Neurólogo, por los aportes realizados al protocolo.

A la Doctora Andrea Naranjo, bacterióloga del Instituto Nacional de Cancerología, por la información relacionada con los aspectos técnicos e interpretación de citometría de flujo en LCR.

Al Instituto Nacional de Cancerología por abrirnos sus puertas, en la búsqueda de información para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia, por el fortalecimiento del espíritu de investigación y trabajo en equipo.

Resumen

Objetivo: Determinar la utilidad de la CMF en LCR al diagnóstico como predictora de supervivencia en adultos con LLA de precursores linfoides B en el INC entre marzo de 2013 y diciembre de 2018.

Metodología: Estudio observacional analítico tipo cohorte histórica, de pacientes con diagnóstico de LLA de precursores linfoides B entre 2013 y 2018, evaluando la asociación de los valores absolutos de la CMF en LCR con la supervivencia global y supervivencia libre de recaída. El análisis de supervivencia global se realizó mediante la curva de Kaplan-Meier, se construyó un modelo de riesgos proporcionales de Cox para valorar el efecto de covariables sociodemográficas y clínicas potencialmente relacionadas.

Resultados: 132 pacientes cumplieron criterios de elegibilidad; 70 hombres y 62 mujeres, la mediana de edad fue de 34 años, el inmunofenotipo común y la anormalidad genética t(9;22) fueron más frecuentemente encontrados. El compromiso clínico del SNC al diagnóstico fue del 6.1%, con mayor frecuencia el síndrome piramidal. En el estudio de LCR, 84,8% de las citologías y el 99,21% de las citometrías fueron interpretables, siendo 14,29% de las CC y 25,4% de las CMF positivas, con una mediana de 0,835 en valor absoluto de blastos/ μ l, el valor mínimo encontrado fue de 0.03 blastos/ μ l, y el máximo 28,9 blastos/ μ l. La supervivencia global y libre de recaída se discriminó por valores de blastos de la CMF al diagnóstico en cuartiles, encontrando que los pacientes con blastos $>$ a 0.085 tenían una probabilidad de supervivencia global menor (p 0.047) y un mayor riesgo de recaída (p 0.027) siendo estadísticamente significativo.

Conclusiones: Los valores absolutos de blastos en citometría de flujo al diagnóstico son predictores de supervivencia global y libre de recaída en LLA de forma independiente.

Palabras clave: (Leucemia linfoblástica aguda, supervivencia global y libre de recaída, citometría de flujo en líquido cefalorraquídeo)

Abstract

Objective: To determine the usefulness of CPM in CSF at diagnosis as a predictor of survival in adults with B-lymphoid precursor ALL in the INC between March 2013 and December 2018.

Methodology: Historical cohort-type analytical observational study of patients diagnosed with B-lymphoid precursor ALL between 2013 and 2018, evaluating the association of absolute values of CMF in CSF with overall survival and relapse-free survival. Overall survival analysis was performed using the Kaplan-Meier curve, a Cox proportional hazards model was constructed to assess the effect of potentially related sociodemographic and clinical covariates.

Results: 132 patients met eligibility criteria; 70 men and 62 women, the median age was 34 years, the common immunophenotype and the genetic abnormality t (9; 22) were more frequently found. The clinical involvement of the CNS at diagnosis was 6.1%, with the pyramidal syndrome most often. In the CSF study, 84.8% of the cytologies and 99.21% of the cytometries were interpretable, with 14.29% of the CC and 25.4% of the CMF positive, with a median value of 0.835. absolute blasts / μ l, the minimum value found was 0.03 blasts / μ l, and the maximum was 28.9 blasts / μ l. Overall and relapse-free survival was discriminated by CMF blast values at diagnosis in quartiles, finding that patients with blasts > 0.085 had a lower probability of overall survival (p 0.047) and a higher risk of relapse (p 0.027) being statistically significant.

Conclusions: Absolute blast values in flow cytometry at diagnosis are independent predictors of overall and relapse-free survival in ALL.

Key words: (Acute lymphoblastic leukemia, relapse-free and overall survival, cerebrospinal fluid flow cytometry)

Contenido

<u>Resumen</u>	XII
<u>Lista de gráficos</u>	XV
<u>Lista de tablas</u>	XVI
<u>Lista de símbolos y abreviaturas</u>	XVII
1. Planteamiento del problema y justificación	3
2. Marco teórico	5
2.1 Generalidades de las Leucemias	5
2.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	6
2.2 Compromiso de SNC por LLA	16
2.3 Métodos de diagnóstico en compromiso de SNC en LLA	19
2.3.1 Citología y citometría de flujo en líquido cefalorraquídeo	19
2.4 Impacto pronóstico de los resultados de LCR en IL	23
2.5 CC y CMF en LCR como guía en el tratamiento de compromiso de SNC en LLA	25
3. Objetivos	27
3.1 Objetivo general	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. Metodología	29
4.1 Tipo de investigación	29
4.2 Hipótesis:	29
4.3 Sujetos del estudio	29
4.4 Criterios de elegibilidad	30
4.4.1 Criterios de inclusión	30
4.4.2 Criterios de exclusión	30
Manejo de variables	31
4.5 Técnicas y procedimientos	35
4.6 Recolección y procesamiento de datos	36
4.9 Control de sesgos	37
5. Consideraciones éticas	38
6. Resultados	41
6.1 Recolección de la información	41
6.2 Análisis descriptivo	43
6.2.1 Características clínicas y de tratamiento	43

Características del tratamiento.....	46
6.3 Compromiso del sistema nervioso	48
6.3.1 Compromiso clínico de sistema nervioso al diagnóstico	48
6.3.2 Compromiso del sistema nervioso por CMF y CC de LCR al diagnóstico	50
6.3.3 Desenlaces de supervivencia	56
6.3.4 Modelo de riesgos proporcionales COX	64
7. Discusión.....	66
8. Conclusiones y recomendaciones	75

Lista de gráficos

	Pág.
Gráfico 1: Diagrama de inclusión de pacientes.....	42
Gráfico 2: Respuesta completa por esquema de primera línea.....	47
Gráfico 3: Distribución del valor de blastos/ μ L en CMF de LCR al diagnóstico.	52
Gráfico 4: Comportamiento de valores de CMF en el seguimiento.	56
Gráfico 5: Supervivencia global en toda la cohorte.	57
Gráfico 6: Supervivencia libre de recaída en toda la cohorte.	58
Gráfico 7: Supervivencia global según compromiso del SNC.	59
Gráfico 8: Supervivencia libre de recaída según compromiso del SNC.	60
Gráfico 9A: Supervivencia global por blastos/ μ L en la primera CMF al diagnóstico.	61
Gráfico 9B: Supervivencia global por blastos/ μ L en la primera CMF al diagnóstico vs CMF negativa.....	62
Gráfico 10: Supervivencia global discriminado por blastos/ μ L > o <de 0,835.	62
Gráfico 11: Supervivencia libre de recaída por valor de blastos/ μ L en la primera CMF al diagnóstico.....	63
Gráfico 12: Supervivencia libre de recaída discriminado por blastos/ μ L > o <de 0,835.....	64
Gráfico 13: Supuesto de riesgos proporcionales.	65

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1:	Clasificación de riesgo de IL por CC.....23
Tabla 2:	Categorización de las variables.....31
Tabla 3:	Características generales de la población44
Tabla 4:	Distribución de cariotipo y pruebas moleculares.....45
Tabla 5:	Cariotipo, leucocitos y número de terapias intratecales.....46
Tabla 6:	Esquemas de tratamiento.....46
Tabla 7:	Leucocitos, edad e intratecales según tratamiento de primera línea.....47
Tabla 8:	Variables de importancia en el tratamiento.....48
Tabla 9:	Compromiso clínico del sistema nervioso.....49
Tabla 10:	Edad y numero de terapias intratecales según compromiso del SNC.....49
Tabla 11:	Resultados de citometría de flujo y citología de LCR al diagnóstico.....50
Tabla 12:	CC y CMF en LCR con punciones lumbares traumáticas.....51
Tabla 13:	Concordancia entre CC y CMF.....51
Tabla 14:	CC y CMF en relación con compromiso clínico de SN51
Tabla 15:	Caracterización de pacientes con CMF positiva al diagnóstico53
Tabla 16:	Caracterización de resultados de CMF y tratamiento.....54
Tabla 17:	Incidencia del compromiso de SN en pacientes con LLA.....55
Tabla 18:	Modelo regresión COX supervivencia.....65
Tabla 19:	Modelo de regresión COX para recaída.....65
Tabla 20:	Cronograma de actividades.....76
Tabla 21:	Presupuesto.....78

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura Término

<i>ADN</i>	Ácido desoxiribonucleico
<i>CC</i>	Citología convencional
<i>CMF</i>	Citometría de flujo
<i>CML</i>	Células madre leucemogénicas
<i>EMR</i>	Enfermedad mínima residual
<i>INC</i>	Instituto Nacional de Cancerología
<i>IL</i>	Infiltración leptomeníngea
<i>LA</i>	Leucemias agudas
<i>LCR</i>	Líquido cefalorraquídeo
<i>LDH</i>	Lactato deshidrogenasa
<i>LLA</i>	Leucemia linfoblástica aguda
<i>PRE-B</i>	Precursores B
<i>SN</i>	Sistema nervioso
<i>SNC</i>	Sistema nervioso central

Introducción

La LLA es una neoplasia agresiva de las células progenitoras linfoides, afecta a niños y adultos (1,20) es más frecuente en hispanos y caucásicos que en raza negra (8), representa una enfermedad devastadora cuando ocurre en adultos. La incidencia sigue una distribución bimodal, con el primer pico en la infancia y un segundo pico alrededor de los 50 a 60 años (2,21,22). Diferentes alteraciones genéticas se involucran en la etiopatogenia, el cromosoma de Philadelphia (Ph) es la alteración citogenética más común observada en LLA-B con una frecuencia creciente con la edad (23).

La LLA -preB que se define por la expresión en la superficie celular de CD10, CD19, CD34 CD79a, HLA-DR y otros antígenos relacionados con las células B, en población pediátrica se ha convertido en una enfermedad altamente curable con tasas de supervivencia a largo plazo por encima del 90%, por el contrario, la supervivencia global a largo plazo en los adultos es de aproximadamente 35 a 45% (21,24).

Las LA y los linfomas no Hodgkin agresivos conforman el grupo de neoplasias hematológicas malignas que mayor predisposición tienen a infiltrar el SNC, con mayor frecuencia en las leucemias agudas de precursores linfoides (7,12,25).

El compromiso de SNC tiene una incidencia reportada de 5 al 10% en adultos con LLA (7) puede presentarse al momento del diagnóstico o durante el seguimiento, llegando a ser más común durante una recaída sistémica. Es un problema clínico de gran importancia al constituir una complicación según algunos estudios a mal pronóstico y disminución en la calidad de vida, además de la decisión trascendental de definir tratamiento profiláctico con quimioterapia y radioterapia que se asocia a efectos adversos por toxicidad (8,15,16).

La persistencia de las recaídas, la necesidad de mejorar la precisión diagnóstica, resaltan la importancia de sumar esfuerzos por entender los mecanismos biológicos, definición, diagnóstico y tratamiento de IL.

El diagnóstico del compromiso en SNC es un reto, está basado en signos, síntomas, evidencia de malignidad en LCR y estudios neuro imagenológicos. La importancia de la búsqueda activa radica en que hasta en el 60% de los pacientes que eventualmente desarrollan recaída en SNC no tienen compromiso clínico evidente al diagnóstico (12).

Respecto al análisis de LCR la CC ha sido considerada como método estándar para la detección de células malignas sin embargo presenta una alta tasa de falsos negativos, de ahí que la citometría de flujo ha surgido como una importante herramienta diagnóstica por incremento en su sensibilidad y especificidad, además determina de forma objetiva la carga tumoral de LCR en contraste con la interpretación morfológica subjetiva de la citología de LCR y permite detectar carga de la enfermedad tan baja como el 0.1% del total de células del LCR (9,13,14,26–28).

Existen escalas pediátricas para la clasificación de IL basados en los hallazgos de CC en LCR (5) y algunos estudios retrospectivos han encontrado asociación entre los resultados de la positividad en CMF y el incremento en el riesgo de recaída en SNC, sugestivo de que incluso una carga baja de enfermedad definida como IL oculta impacta clínicamente en los resultados de supervivencia (17,29–32).

Surgen muchos interrogantes respecto a las definiciones de IL para cada tipo de neoplasia hematológica, adicionalmente estudios han evaluado la posibilidad que la CMF puede ser una herramienta para identificar subgrupos que podrían beneficiarse de una terapia intensificada, sin embargo, la significancia clínica de la CMF como un factor de riesgo después de detectar IL es incierto y estos hallazgos no han sido estandarizados en población colombiana.

1.Planteamiento del problema y justificación

El compromiso del SNC en LLA al ser un sitio frecuente de recaídas se asocia con alta morbilidad, se ha convertido en un desafío diagnóstico ante la ausencia de un método estándar ideal disponible para su identificación temprana, adicionalmente los tratamientos en adultos relacionados en la decisión de profilaxis de SNC son en su mayoría adoptados de protocolos establecidos en población infantil.

El uso de CC y CMF como método para evaluar el compromiso de SNC en LLA y guiar decisiones terapéuticas basados en sus resultados es controversial y necesita ser interpretado acorde a las características del paciente y variables poblacionales específicas.

Surge entonces la importancia de describir las características clínicas y de laboratorio de la población local, en un centro de referencia nacional de este tipo de patología, en donde se evalúe una muestra con características homogéneas, en un solo estadio clínico, para posteriormente contrastarlos con registros de historias clínicas que permitan evaluar la supervivencia global, esto justificado en que no hay estudios recientes de este tipo en población colombiana.

Se pretende que con los resultados obtenidos del presente estudio se logren describir los valores absolutos en CMF utilizados para definir compromiso de SNC y poseer evidencia sobre la relación entre la CMF en LCR, LLA, y supervivencia con el ánimo de aportar información y herramientas para los lineamientos del tratamiento de esta entidad.

En este sentido se ha planteado la siguiente pregunta de investigación: ¿En pacientes con LLA de precursores linfoides B en el INC entre marzo de 2013 y diciembre de 2018, los valores absolutos de CMF en LCR en la primera muestra tomada al diagnóstico se asocian con la supervivencia global y libre de recaída?

2.Marco teórico

2.1 Generalidades de las Leucemias

Las leucemias son un grupo de enfermedades malignas caracterizadas por infiltración de células neoplásicas del sistema hematopoyético en la sangre, la medula ósea y otros tejidos, si no se tratan oportunamente llevan a desenlaces desfavorables para el paciente (21). De acuerdo al linaje de células afectadas se clasifica en mieloide o linfóide, y de acuerdo al tiempo de evolución se clasifican en agudas y crónicas (21,33,34).

Hay cuatro clasificaciones amplias de leucemia: Leucemia linfocítica aguda (LLA) Leucemia mieloide aguda (LMA), Leucemia linfocítica crónica (LLC), Leucemia mieloide crónica (LMC) (21).

Estas enfermedades pueden presentarse en todas las edades, su prevalencia generalmente es mayor en personas de raza blanca, en hombres y aumenta con la edad, aproximadamente una de cada 70 personas desarrolla leucemia en su vida (34).

De acuerdo con el registro de Globocan de 2018, se encontraron 437.033 nuevos casos de leucemia, y 309.066 muertes debido a leucemia a nivel mundial. En ambos sexos la incidencia para Latinoamérica y el Caribe fue de 36.804 personas (8.4%), la mortalidad 26.222 (8.5%) y la prevalencia a 5 años 101.256 (8.6%), ocupando el cuarto lugar después de Asia, Europa y Norte América (35).

En Colombia las leucemias ocupan el cuarto lugar en mortalidad por cáncer, en registros del 2007 al 2013 se encontró que la tasa de mortalidad ajustada por edad para los hombres fue de 4,0 por 100.000 y de 3,2 por 100.000 en las mujeres, para una razón de tasas hombre : mujer de 1,25 (36).

Existen ciertos factores de riesgo relacionados con el desarrollo de este tipo de neoplasias hematológicas como son los síndromes genéticos, exposición ambiental y ocupacional a sustancias tóxicas, historia de malignidad hematológica, obesidad, entre otros (34).

La presentación clínica de la leucemia puede ser variada, en esto radica la importancia de una adecuada anamnesis y examen físico (37). En los adultos pueden estar presentes síntomas constitucionales como fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso inexplicable, síntomas relacionados con anemia como disnea y dolor torácico, síntomas asociados a la trombocitopenia como equimosis, epistaxis, alteraciones menstruales en las mujeres, hay menor probabilidad de encontrar en los adultos dolor óseo, hepatoesplenomegalia y linfadenopatías y el compromiso del sistema nervioso central se encuentra de forma general con mayor frecuencia en leucemia linfoblástica aguda (34,38).

Para el diagnóstico de leucemia se requiere realizar aspirado de médula ósea, su utilidad radica en precisar una mayor concentración de células hematopoyéticas e identificar las células blásticas, también es importante realizar examen de conjunto de cromosomas a través de cariotipo o fluorescencia, detección del cromosoma Filadelfia (gen de fusión BCR-ABL1) que tendrá grandes implicaciones en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. La citometría de flujo con inmunofenotipificación se realiza con el fin de diagnosticar subtipos, identificando ciertos marcadores de superficie celular y pruebas moleculares para mutaciones específicas del ADN a través de pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (34).

El tratamiento para la leucemia depende de varias características: el centro de referencia, edad, comorbilidades y características del paciente, el tipo de leucemia, la citogenética, los hallazgos moleculares. Existen diferentes esquemas de tratamiento, que en forma general incluyen quimioterapia sistémica y/o intratecal, radiación, uso de anticuerpos monoclonales o trasplante de células hematopoyéticas.

2.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Definición

La LLA es una neoplasia hematológica agresiva, que consiste en un desorden de proliferación clonal de células progenitoras de un linaje linfóide ya sea B o T(3,39,40). El

85% de los casos afecta precursores linfoides B y en el 15% restantes a los precursores linfoides T (41).

Epidemiología

De acuerdo a informes del Fondo Colombiano de Enfermedades del Alto Costo del 2015, en Colombia la LLA ocupa el vigésimo segundo lugar en prevalencia en la población de pacientes con cáncer, y el segundo lugar como el tumor hematolinfático más frecuente. Se encontró un pico en la población de adultos más jóvenes entre los 18 y 24 años de edad, con una mediana de 27 años (36,42).

La prevalencia en el país en leucemia linfocítica aguda se ubicó en 1.8 casos por cada 100.000 habitantes con edad igual o mayor a 18 años, los departamentos con mayor prevalencia de LLA en Colombia son: Antioquia, Boyacá, Bogotá D.C., Caldas, Casanare, Cundinamarca, Risaralda, y Vichada (36).

La incidencia en el país de LLA fue de 0.3 casos nuevos por 100.000 habitantes de 18 o más años, las mayores incidencias se encuentran agrupadas en el centro y occidente del país; entre los departamentos más afectados están: Caldas, Nariño, Atlántico, Caldas, Meta, Casanare, Boyacá, Cundinamarca y Bogotá D.C (36).

Patogénesis

El desarrollo de las células linfocíticas está regulado por diferentes procesos que tienen que ver con la diferenciación y la proliferación de precursores de células en: el timo, ganglios linfáticos, bazo y médula ósea. Las anomalías genéticas llevan a la detención en el desarrollo de los precursores de linfocitos, estas anomalías corresponden a aberraciones cromosómicas o mutaciones cercanas a las regiones promotoras y de regulación de la expresión de genes encargados de procesos de proliferación y muerte celular. Algunos de estos genes son: ETV6- RUNX1, BCR-ABL1, TAL1, entre otros (43). Estas alteraciones genéticas se pueden generar por translocaciones cromosómicas, como por ejemplo la translocación t (9;22) o cromosoma Filadelfia o la translocación cromosómica específica, t (1;19)(q23;p13) (43). También se han encontrado mutaciones en protooncogenes supresores de tumor y en genes asociados a cascadas de señalización como NOTCH o RAS.

La LLA se perpetua debido a una población de células neoplásicas denominadas células madre leucemogénicas (CML) o células iniciadoras de leucemia, ya que dan origen a diferentes linajes de células, caracterizadas por una proliferación anormal y un reclutamiento en estadios tempranos de maduración. Las CML se mantienen gracias a que cuentan con características de células madre como: autorrenovación y quiescencia, y juegan un papel importante ya que son las responsables de las recaídas en los pacientes tras los tratamientos (39).

Características anatómicas

Se presume que la LLA surge de la transformación maligna de las células progenitoras B o T (44). La enfermedad se caracteriza por la acumulación de linfoblastos en la médula o en sitios extramedulares, sumado a la supresión de la hematopoyesis normal. Las células leucémicas linfoblásticas tanto B como T expresan diferentes antígenos de superficie similares a sus linajes, lo cual permite su respectiva caracterización. En las LLA de precursores B se encuentra expresión en su superficie celular de CD10, CD19 y CD34 junto con la dioxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) nuclear, y en la LLA de precursores T expresión de CD2, CD3, CD7, CD34 y TdT (33).

Factores de riesgo asociados a desarrollo de LLA

Existen ciertos factores de riesgo relacionados con la aparición de LLA, entre ellos están: algunos síndromes genéticos como el Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, Síndrome de Nijmegen, ataxia-telangiectasia, neurofibromatosis, entre otros. También se ha encontrado como un posible factor precipitador de la enfermedad la exposición a radiación ionizante, el consumo de tabaco y la exposición a ciertos pesticidas y solventes principalmente en los primeros tres años de vida (34).

Otros factores de riesgo implicados en el desarrollo de LLA son: un antecedente de neoplasia hematológica, ya que predispone a desarrollar a futuro otro subtipo de leucemia, el género es otro factor importante, se ha visto que la LLA es una enfermedad más común en hombres con un 57% de casos de LLA, y la obesidad también se ha encontrado implicada en el desarrollo de LLA (39).

Factores pronósticos

El establecimiento del pronóstico en los pacientes con LLA es una tarea compleja, existen ciertos factores con implicaciones en la clasificación de la enfermedad y la predicción de la respuesta a los diferentes esquemas de tratamiento, entre ellos están:

- La edad: los pacientes más jóvenes suelen tener un mejor pronóstico que los pacientes mayores. No existe un límite para esto, pero generalmente las personas menores de 50 años de edad tienen un mejor pronóstico, los pacientes de más edad son más propensos a tener anomalías cromosómicas desfavorables y comorbilidades asociadas (43,45).
- Conteo elevado de leucocitos: un conteo elevado de glóbulos blancos está asociado con una alta tasa de proliferación y una alta carga tumoral (8,39)
- Compromiso del SNC: así como en la LLA infantil, los pacientes adultos con LLA también están en peligro de presentar complicaciones asociadas a compromiso del SNC durante el curso de su enfermedad, que influye tanto en el tratamiento como en el pronóstico de la enfermedad (29,46).
- Morfología celular: los pacientes con una morfología L3 muestran mejores resultados, de acuerdo con el tratamiento específico.
- Las anomalías cromosómicas se usan como biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos para proporcionar subtipo, resultado e información de respuesta a medicamentos. t (12; 21) / ETV6-RUNX1 son biomarcadores pronósticos de buen riesgo, mientras que translocaciones KMT2A (MLL) t (17; 19) / TCF3-HLF son biomarcadores de alto riesgo (47). Los pacientes con LLA positivos al Ph1 t(9;22) que corresponden a cerca del 25% de los pacientes con LLA pre-B, incidencia que incrementa con la edad cerca al 50% en pacientes mayores a 50 años. Se ha descrito que estos pacientes tienen un pronóstico precario ya que su curación con quimioterapia puede ser difícil, sin embargo en la actualidad la supervivencia en pacientes con LLA-pre B ha demostrado mejoría con la adición de inhibidores de la tirosina cinasa *BCR-ABL* (23).
- Las ploidias cromosómicas proporcionan una gran cantidad de información con respecto al pronóstico de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda; hiperdiploidia definido por la presencia en el cariotipo de las células leucémicas con más de 50 cromosomas, relacionado con mejor pronóstico; hipodiploidia presencia en el cariotipo de las células leucémicas con menos de 44 cromosomas (48).

Otras anomalías cromosómicas con pronóstico precario son t(4;11), que se caracteriza por reordenamientos del gen *MLL*, también la delección del cromosoma 7 o trisomía 8 tienen menos probabilidades de supervivencia a 5 años comparados con pacientes de cariotipo normal (45).

- Etnia: en diferentes estudios se ha demostrado que la incidencia es mayor en pacientes de América y Oceanía y es más baja en Asia y Europa Oriental, con implicaciones también en la respuesta al tratamiento, comparando diferentes poblaciones los pacientes hispanos y afrodescendientes generalmente tienen un pronóstico desfavorable. (39,45).
- Enfermedad Mínima residual: es uno de los factores más relevantes para determinar el nivel de riesgo de los pacientes con LLA, ya que después de las fases de inducción y consolidación de la quimioterapia, la detección de enfermedad mínima residual es fundamental para tomar decisiones con respecto a la elección del tratamiento, definir si estos pacientes se benefician de tratamientos intensificados (39). Es un término que se usa después del tratamiento cuando no se pueden encontrar células leucémicas en la médula ósea con pruebas de laboratorio convencionales (como la observación de las células con el microscopio), pero que aún pueden detectarse con pruebas más sensibles (como citometría de flujo o reacción en cadena de la polimerasa o PCR).
- Relacionadas con la respuesta al tratamiento: los pacientes que logran una remisión completa en 4 o 5 semanas a partir del inicio del tratamiento, suelen tener un mejor pronóstico, los pacientes que no logran una remisión completa tienen un pronóstico más desfavorable (8).

Diagnóstico

El diagnóstico y la clasificación de la LLA requiere un constructo de hallazgos clínicos y una serie de parámetros hematológicos, las técnicas diagnósticas múltiples incluyen:

-Microscopía (morfología, citoquímica e histología): consiste en el estudio de la morfología en la sangre periférica, el aspirado de médula ósea, las improntas y la biopsia de médula ósea (4).

-Inmunofenotipificación (citometría de flujo y/o inmunohistoquímica): la citometría de flujo es el método recomendado en todos los casos, requiere muestra en fresco de médula ósea

o sangre periférica (cuando hay células blásticas en la periferia), su importancia radica en determinar el linaje de los blastos y detección de aberraciones antigénicas (49).

-Inmunohistoquímica: se puede realizar en el material fijado y decalcificado de la biopsia de médula ósea y puede utilizarse en algunos especímenes con limitaciones para realizar citometría de flujo, como aspirados secos, médulas impactadas o hemodilución (49).

-Genética (cariotipo convencional, FISH y/o genética molecular): se realiza en muestras en fresco de aspirado de médula ósea y permite la identificación de algunos de los subgrupos pronósticos, los de pronóstico adverso han sido considerados: t(9;22)(q34;q11.2) (22).

Clasificación

Se han usado diferentes sistemas para clasificar los subtipos de LLA. En los años 70, un grupo de franceses, estadounidenses y británicos (FAB) expertos en leucemia dividieron la LLA en tres subtipos (L1, L2 y L3), de acuerdo con hallazgos microscópicos. Este sistema, conocido como clasificación FAB, ha sido reemplazado con el descubrimiento de nuevas técnicas diagnósticas, logrando una clasificación con base en los cambios cromosómicos y genéticos de las células leucémicas. El sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualizado recientemente en 2016, incluye algunos de estos factores para tratar de clasificar mejor la LLA, así (50):

Leucemia/linfoma linfoblástico de células B:

- Leucemia/linfoma linfoblástico B, no especificado de otra manera
- Leucemia/linfoma linfoblástico B con alteraciones genéticas recurrentes
- Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1
- Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(v;11q23.3); reordenamiento KMT2A
- Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
- Leucemia/linfoma linfoblástico B con hiperdiploidía
- Leucemia/linfoma linfoblástico B con hipodiploidía
- Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(5;14)(q31.1;q32.3); IL3-IGH
- Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(1;19)(q23;13.3); TCF3-PBX1
- Entidad provisional: leucemia/linfoma linfoblástico B, BCR-ABL1-like
- Entidad provisional: leucemia/linfoma linfoblástico B con iAMP21

Leucemia/linfoma linfoblástico de células T:

- Entidad provisional: leucemia linfoblástica de célula T precursora temprana
- Entidad provisional: leucemia/linfoma linfoblástico de células NK

Leucemias agudas de linaje mixto

Tratamiento

La quimioterapia es el tratamiento efectivo más utilizado en LLA. En población pediátrica se han logrado remisiones completas en aproximadamente 80% de los pacientes, sin embargo en adultos estas tasas son del 40%, con una supervivencia a 5 años del 30-40%, considerando que las recaídas son más frecuentes, asociación de comorbilidades y toxicidad del tratamiento (44).

Los esquemas de tratamiento constan de tres fases: inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento. La fase de inducción incluye varios medicamentos: vincristina, un corticoesteroide, una antraciclina y ciclofosfamida o asparaginasa y quimioterapia intratecal. En la fase de consolidación consiste en dosis altas de Metotrexato con adición o no de Asparaginasa y dosis altas de Citarabina, con un número de bloques variable dependiendo del esquema, respuesta y el grupo de riesgo. En la fase de mantenimiento se administran antimetabolitos orales y vincristina en dosis mensuales por dos años con o sin refuerzos periódicos (1,2,4,15).

La terapia de prevención de compromiso del SNC ha sido establecida desde los años 60 ya que la recurrencia en SNC podría significar resistencia y progresión de la leucemia. Las células leucémicas, que no se detectan en el LCR en el momento del diagnóstico, pueden proliferar más adelante, debido a que los agentes antileucémicos administrados sistémicamente no logran penetrar la barrera hematoencefálica (5,16).

La quimioterapia intratecal que consisten principalmente en Metotrexato intratecal se administra en la fase de inducción, si se utilizan en la fase de mantenimiento proporcionan una adecuada prevención para compromiso de SNC. La radioterapia craneal ya no se usa en pacientes con buen pronóstico. (5,22,51).

En los últimos años se ha avanzado en nuevos tratamientos complementarios a la quimioterapia, como la inmunoterapia para erradicación de CML y el trasplante de medula ósea, que pretende reestablecer la hematopoyesis normal en los pacientes con LLA. Los

tratamientos actuales no son 100% efectivos, se requiere estudio y desarrollo de nuevas terapias para lograr ese objetivo (2,39,52).

Se han planteado diferentes definiciones de las variables de respuesta al tratamiento, estas son (15):

- *Remisión completa*: recuento de blastos menor del 5% en medula ósea después del inicio de tratamiento.
- *Supervivencia global*: tiempo desde el momento del diagnóstico, hasta el momento de muerte por cualquier causa o del último control.
- *Supervivencia libre de enfermedad*: tiempo desde la remisión completa hasta el momento de la recaída, definida como la presencia del 5% o más linfoblastos en médula ósea.
- *Muerte durante la inducción*: Muerte por cualquier causa antes de alcanzar remisión completa.
- *Coexpresión mieloide*: Expresión de marcadores mieloides asociados como son CD 13 y CD 33.

Tratamiento de LLA en Adultos

De acuerdo a la guía colombiana de práctica clínica para la detección, tratamiento y seguimiento de leucemias linfoblástica y mieloide en población mayor de 18 años publicada en 2017, se plantean diferentes esquemas y estrategias de tratamiento, teniendo en cuenta en grupo etario, así:

- En pacientes jóvenes (18 a 21 años) uso de protocolos de quimioterapia diseñados para población pediátrica.
- En pacientes menores de 60 años uso de esquemas basados en la experiencia de cada centro hematológico, los esquemas Hyper-CVAD, GRAALL-2003, MRC UKALL XII/ECOG E2993; GMALL y PETHEMA son los que cuentan con más experiencia en Colombia y los más utilizados.
- En pacientes con positividad en cromosoma Filadelfia, adicionar Imatinib o Dasatinib a la quimioterapia de inducción y consolidación.

-En pacientes con EMR positiva, luego de haber logrado remisión completa con quimioterapia, considerar intensificación del tratamiento, en particular trasplante alogénico.

-En pacientes mayores de 60 años con LLA el tratamiento deberá realizarse individualizando cada paciente, los esquemas de tratamiento VAD, CALGB, GMALL y otros, tienen resultados similares y experiencia en Colombia, no hay recomendación del alguno en particular

-El trasplante alogénico en pacientes adultos con LLA tiene muy buenos resultados preferiblemente en pacientes menores de 35 años en postremisión, en enfermedad refractaria a la inducción o en recaídas. (GPC)

El esquema Hyper-CVAD en los ciclos 1,3,5, y 7 los pacientes reciben ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona, en los ciclos 2,4,6 y 8 Metotrexato, Citarabina y metilprednisolona. La profilaxis de sistema nervioso central consiste en administración de Metotrexate 12 mg intratecal (IT) el día 2 de cada ciclo, y Citarabina 100 mg IT en el día 8 de cada ciclo de la fase de inducción. El mantenimiento (2 años) consiste en administración de Mercaptopurina, Metotrexate, Prednisona y Vincristina. (1,15,43)

Los pacientes con alto riesgo de compromiso de sistema nervioso central reciben 16 quimioterapias intratecales, pacientes de bajo riesgo 4 terapias intratecales, y pacientes sin conocimiento de riesgo reciben 8 quimioterapias intratecales. Así mismo el tratamiento de terapia intratecal también se ha basado en administrarla hasta que la citología del líquido cefalorraquídeo sea negativa. (15,40)

En otros esquemas Citarabina e hidrocortisona a veces se agregan al metotrexato para la terapia intratecal triple (TIT), ningún medicamento es específico, la combinación es óptima.

Múltiples inyecciones se usan en terapia intratecal, en algunos protocolos para adultos hasta 19, se administran rutinariamente durante los primeros 1 a 2 años de tratamiento. El número óptimo de inyecciones está basado en la respuesta de cada paciente. La frecuencia de la terapia de IT es mayor durante las etapas de inducción y consolidación y luego se vuelve menos frecuente durante la terapia de mantenimiento (5).

En pacientes con recaída del compromiso en SNC, la irradiación craneal tiene ventajas en este escenario, algunas de ellas son: las células de LLA resistentes a la quimioterapia siguen siendo bastante sensibles a la radiación, el efecto citotóxico de la radiación es

rápido, se logra un alivio rápido de la presión sobre los nervios craneales sensibles preservando así la función neurológica, el tratamiento se inicia el mismo día, los adultos toleran los tratamientos de radiación de cráneo completo de 24 a 30 Gy, y por último la irradiación puede emplearse incluso cuando los pacientes están citopénicos con la quimioterapia (5).

Recaídas

Se define como el resurgimiento de las células blásticas después de la remisión completa, se clasifican y se estratifican según tres factores pronósticos:

- Tiempo de recaída: es el más importante, en relación con el inicio y el final del tratamiento.
- Sitio de recaída: comúnmente se dividen en médula ósea (BM) sola (peor pronóstico), extramedular solo (mejor pronóstico) y recaídas combinadas (pronóstico intermedio).
- Inmunofenotipo B o T: Aunque el inmunofenotipo T inicialmente se asoció con mala supervivencia, su valor pronóstico parece ser menos importante debido a mejor estratificación.

Las recaídas pueden originarse a partir de un clon quimioresistente, ya sea presente como un clon menor en el momento del diagnóstico o como resultado de la adquisición de mutaciones secundarias durante el tratamiento, también puede explicarse por la presencia de células latentes quiescentes menos sensibles a los agentes citotóxicos.

Ocurren con mayor frecuencia en médula ósea, como sitio aislado o combinado de recaída en el 75-90% de los casos (4)

Varios estudios han reportado que las recidivas extramedulares ocurren en aproximadamente el 40% de los casos (aproximadamente el 20% combinado y 20% presuntamente aislados). Las recaídas aisladas del SNC representan aproximadamente el 7,5-15% de las recaídas de LLA (14).

2.2 Compromiso de SNC por LLA

El SNC es un sitio importante de compromiso por LLA en adultos, siendo la IL la forma más común, al ser considerado como un nicho protector o santuario, tiene un microambiente favorable en el que células leucémicas están protegidas y pueden escapar a la quimioterapia sistémica y, por lo tanto, ser una fuente potencial de origen de recaída (25).

Epidemiología

El compromiso del SNC en LLA al momento del diagnóstico se ha descrito en el 5-10% de los casos en adultos (29,45) siendo más común durante una recaída sistémica, la probabilidad de una recaída aislada del SNC para adultos que han logrado una remisión es de alrededor del 5% con el uso de terapias actuales (5).

En niños con LLA, el riesgo de afectación del SNC es del 75% entre los pacientes que no tienen una profilaxis apropiada, mientras que en adultos sin profilaxis ocurre en aproximadamente el 30% de los casos (16).

Los tratamientos actuales han reducido a menos del 10% la incidencia de recaídas del SNC sin embargo siguen representando hasta el 40% de todas las recaídas (53).

Definiciones actuales

Aunque se conoce la importancia de la detección temprana del compromiso en SNC, no se han estandarizado las definiciones de los puntos de corte en las herramientas diagnósticas disponibles en LCR, que permitan tener una definición clara de compromiso en SNC tanto al diagnóstico como al seguimiento, para cada tipo de neoplasia hematológica, incluyendo LLA.

Tradicionalmente la IL ha sido definida por la presencia de 5 o más leucocitos por microlitro y presencia de blastos en LCR en CC o por la presencia de signos y síntomas o una neuroimagen positiva (5). Sin embargo, hoy se conoce que células leucémicas incluso en niveles submicroscópicos y con algunos marcadores específicos pueden tener un efecto sustancial en el origen de recaídas (18).

No existe aún un consenso sobre la cantidad de eventos celulares detectados por CMF considerados diagnósticos, en algunos estudios 25- 30 eventos con fenotipos definidos se han considerado positivos, otros estudios reportan 10 eventos, todo a la luz de un entorno clínico adecuado (13). De manera que se requieren estudios adicionales que permitan establecer estos umbrales de positividad.

Fisiopatología

Múltiples factores biológicos se han relacionado con el riesgo de recaídas en LLA en SNC, la comprensión de la fisiopatología es de gran importancia para el desarrollo de terapias específicas y más efectivas (25).

La leucemia del SNC en estadios tempranos está confinada a las leptomeníngeas sobre un área focal cortical silente, se localiza preferentemente en el espacio subaracnoideo y áreas perivasculares. Estudios en autopsias de pacientes con LLA demuestran un compromiso inicial de las paredes de las venas aracnoideas superficiales, invadiendo los alrededores del tejido conectivo de las trabéculas aracnoideas lo que explica que los pacientes cursan generalmente asintomáticos (54).

Inicialmente el LCR está libre de células malignas, pero cuando las trabéculas aracnoideas son destruidas las células se liberan y proliferan, extendiéndose en los tejidos meníngeos profundos alrededor de los vasos de la corteza y sustancia blanca (espacios de Virchow-Robin), para posteriormente diseminarse alrededor de los nervios craneales generando parálisis de estos o en el caso del nervio óptico infiltración de la retina, finalmente la membrana pia-glial es destruida y las células leucémicas invaden el parénquima cerebral.

Existen varias vías de entrada propuestas: sistema circulatorio por el compromiso de las paredes de venas aracnoideas superficiales; migración directa de huesos craneales por venas puente; extravasación por vénulas meníngeas postcapilares a través de la barrera leptomeníngea-sangre al espacio subaracnoideo y espacios de Virchow-Robin que es una directa comunicación con el LCR, siendo un sitio de presentación antigénica e inmune.

Varios mecanismos moleculares se han estudiado para explicar el neurotropismo de las células leucémicas, muchos basados en la alteración de condiciones locales específicas,

citoquinas, quimiocinas y otros factores solubles que alteran la vigilancia inmune del SN (55).

El LCR de individuos sanos contiene células T predominantemente CD4 que expresan receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR7, este último se ha encontrado con una regulación aumentada en muestras de LLA-T y ha mostrado ser esencial para la entrada de células malignas por la interacción con ligandos CCL19 expresado en el endotelio del plexo coroideo, se ha encontrado también que las células T de LCR expresan CXCR3 altos, así como moléculas de adhesión VLA4, moléculas que pueden contribuir a la entrada de células leucémicas en el plexo coroideo (56).

Otro factor potencial de invasión de SNC es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), niveles que se han encontrado altamente expresados en pacientes con leucemia en SNC, incrementando la migración transendotelial de células LLA invitro y asociado a la supervivencia de células leucémicas en SNC (56).

Respecto a LLA – PB los mecanismos no son tan claros, algunos mecanismos propuestos están relacionados con la expresión de CXCR4, el receptor para CXCL12 también conocido como factor 1 alfa derivado del estroma (SDF1 α), que desempeña un papel importante en neurogénesis y migración de las neuronas durante el desarrollo, se cree que las células pueden ser atraídas hacia áreas perivasculares con expresión de CXCL12 y permanecer en un estado quiescente jugando un papel importante en la migración de células leucémicas en SNC. Otros estudios relacionan proteínas de unión como VE-cadherina y moléculas de adhesión celular endotelial 1 (PECAM 1) con la interacción entre LLA e invasión de células endoteliales en SNC (55,57).

Factores pronósticos de compromiso de SNC en LLA

Varios factores se han asociado con alto riesgo de incidencia de compromiso inicial o recaídas en SNC, entre ellos (58–60):

- Edad: en niños < 12 meses > 9 años.
- Fenotipo células B maduras de LLA en adultos
- Presencia de masa mediastinal

- Recuentos de leucocitos >50.000 células $\times 10^9/L$
- Alteraciones genéticas como: t (9;22) (q 34;q11) con BCR-ABL; t(4;11) con MLL-AF4; inv 16 y t(1;19) con E2A-PBX1
- Presencia de blastos en LCR superior a 5 WBC/UI.
- Niveles de LDH superiores a >3000 UI/l

2.3 Métodos de diagnóstico en compromiso de SNC en LLA

Actualmente, no hay un método estándar disponible para el diagnóstico de enfermedad del SNC en LLA, hasta el 60% de los pacientes que eventualmente desarrollan recaída en SNC no tienen compromiso clínico evidente al diagnóstico (19).

Las manifestaciones clínicas incluyen: crisis convulsivas, alteración del estado de consciencia, cefalea, déficits sensitivos y motores focales, alteración en la función esfinteriana, diplopía o alteraciones visuales, secundario al compromiso de nervios craneales (más común parálisis del tercer par, sexto par y parálisis facial), comprensión medular, hemorragia o isquemia en SNC (12).

La aparición de signos y síntomas neurológicos en cualquier tiempo de evolución debe ser investigado a profundidad considerando como primera posibilidad una recaída, los diagnósticos diferenciales son amplios e incluyen migraña, parálisis de Bell, Herpes Zoster u otras infecciones, miositis orbitaria, síndrome de Guillain Barre y síndrome de Horner entre otros (12).

La tomografía de cráneo y resonancia cerebral (IRC) tienen un valor limitado en la detección de IL, no se realizan de rutina en pacientes asintomáticos, son útiles cuando son positivas, pero cuando son negativas, se requieren métodos alternativos.(11,61).

2.3.1 Citología y citometría de flujo en líquido cefalorraquídeo

El estudio de LCR es esencial en el enfoque diagnóstico inicial, se disponen dos métodos de análisis frecuentemente utilizados en diferentes estadios clínicos (13):

Citología convencional en LCR

Es un análisis cualitativo del examen morfológico de células en LCR, y varios factores influyen en el análisis de los resultados, entre ellos que la muestra requiere un procesamiento inmediato para prevención de lisis celular, idealmente dentro de 1 hora posterior a la toma; el volumen de muestra de al menos 10 cc y el sitio de selección de muestra dada la naturaleza multifocal de la IL (62,63).

La inspección macroscópica proporciona información importante, se debe tener en cuenta en las punciones lumbares traumáticas, que una contaminación sanguínea genera un aumento en el recuento de leucocitos en LCR. El recuento de células se evalúa manualmente utilizando una cámara de conteo de Fuchs-Rosenthal o Neubauer o por dispositivos de conteo automatizado y se definen niveles de pleocitosis del LCR: leve (5–50 / mL); moderada (50–150 / mL) o severo (150–3,000 / mL) (63).

Posterior a la centrifugación la muestra se evalúa con tinciones de May–Grunwald–Giemsa. En meningitis neoplásica suelen aparecer células grandes, irregulares con núcleos hipercrómicos, nucleolos prominentes y oscuros, citoplasmas basofílicos (63).

Los resultados son reportados como negativos, atípicos, sospechosos o positivos, la escasez de células en el LCR y la presencia de linfocitos atípicos pueden hacer que el diagnóstico de IL por este método sea incierto. Tiene una especificidad superior al 95% para IL pero una sensibilidad baja alrededor del 50%, con una alta tasa de falsos negativos reportada del 20 al 60% para tumores sólidos y neoplasias hematológicas (60,64). En estudios de autopsias aproximadamente el 40% de pacientes con IL confirmada tenían una citología inicial negativa.

Citometría de flujo en LCR

Es una técnica de avanzada y automatizada que evalúa parámetros de tamaño, complejidad e inmunofenotipo celular, emplea anticuerpos monoclonales (AcMo) unidos a fluorocromos, que son detectados y visualizados mediante un sistema informático apropiado y de forma rápida, identifica antígenos de superficie y citoplasmáticos, cuantifica

la intensidad antigénica por medio de los canales medios de fluorescencia y emplea múltiples marcajes para detectar la coexpresión de antígenos aberrantes sobre el mismo blasto (13).

La identificación de los blastos leucémicos debe realizarse en conjunto con otros marcadores para garantizar el correcto diagnóstico de la enfermedad, en los últimos años el Consorcio Europeo Euroflow ha validado y estandarizado para la rutina clínica los protocolos técnicos, las clonas de anticuerpos, los paneles inmunofenotipos en 8 fluorescencias, los citómetros de flujo y los análisis e interpretación de estos paneles (9,14,65).

Para las neoplasias hematológicas la CMF se ha convertido en una herramienta importante, se basa en la determinación objetiva de carga tumoral de LCR, se usa ampliamente en el diagnóstico de LLA, definición de subtipo y seguimiento de enfermedad residual mínima (ERM) (14).

Tiene importantes ventajas respecto a la CC, dentro de ellas el aumento en la detección de compromiso de SNC en 20% - 30%, con una sensibilidad del 89 a 95% y especificidad de 89-100% (28,66,67), esto basado en que es capaz de enriquecer posibles células malignas con técnicas para poblaciones mixtas, evalúa simultáneamente marcadores de superficie, detecta un amplio espectro de características celulares, determina celularidad en números absolutos, diferencia procesos neoplásicos de procesos hematopoyéticos reactivos (64).

La CMF puede ser usada para detectar enfermedad mínima residual en LCR con cargas celulares tan bajas como el 0,1% del total de células, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10 000 células normales. (19,68). Una limitación es que las células se deterioran con rapidez, especialmente las muestras paucicelulares que contienen escaso volumen y pierden muy rápidamente viabilidad, por lo que requiere el uso de un estabilizador para que la muestra pueda ser analizada hasta 18 horas después de la toma.

Recientemente se ha publicado el uso del Transfix (cytomark) que previene la muerte celular gracias a la acción del aldehído alifático (AA) que fija leucocitos por entrecruzamiento con residuos de aminoácidos y también contiene sales de metal pesado

que estabilizan leucocitos y reducen la autofluorescencia causada por AA. (69). La selección de anticuerpos debe determinarse por los hallazgos citológicos en combinación con la historia clínica del paciente y debe tenerse en cuenta al analizar los resultados (60).

Es importante enfatizar que aunque la CMF tiene una sensibilidad considerablemente más alta que la CC, los puntos de corte definidos como IL positiva son arbitrarios, no han sido estandarizados, sus resultados pueden variar de una institución a otra y no hay estudios que diferencien estos resultados para cada tipo de neoplasia hematológica (32).

Estudios de concordancia entre CMF y CC

Diversos estudios han establecido la importancia de las dos pruebas en pacientes con sospecha de IL. Un análisis retrospectivo estableció una concordancia del 87% entre las dos pruebas, con diferencias en el 4% de los especímenes, sin embargo, las evaluaciones no estaban cegadas en el momento del diagnóstico lo que pudo contribuir a la alta tasa de acuerdo (13).

Un análisis prospectivo de muestras consecutivas de LCR comparó y evaluó el rendimiento de los métodos manuales, CC y CTM, de pacientes de todas las edades con LLA en 3 etapas clínicas: nuevo diagnóstico, sospecha de recaída y después del tratamiento de recaída. Los resultados determinaron que la CC detecta la enfermedad del SNC en hasta el 10% de los pacientes en el momento del diagnóstico de LLA, y este porcentaje es significativamente más bajo que casi el 30% reportado por CMF (65).

Un estudio que analizó 300 pacientes con LLA recién diagnosticada, 87 (29%) tenían alteración del LCR por CMF, mientras que la CC fue positiva en solo 30 (10%) de 299 pacientes con datos de CC disponibles ($P < 0,001$). En pacientes con CMF + / CC + hubo un mayor recuento de blastos leucémicos en LCR en comparación con los pacientes positivos solo por FCM (0,10 frente a 0,017). Los pacientes positivos por CMF tuvieron mayor recuento de leucocitos en sangre periférica que pacientes negativos por FCM y con mayor frecuencia tenía LLA de células T (18/87 vs. 16/213) (17).

2.4 Impacto pronóstico de los resultados de LCR en IL

La importancia de sospechar y confirmar posteriormente una posible IL radica en la necesidad de administrar al paciente, de manera precoz, un tratamiento quimioterápico intratecal. La evolución de este cuadro, si no se actúa con rapidez, puede ser mortal.

Varios estudios han explorado la relación existente entre los hallazgos en LCR con resultados en desenlaces clínicos mixtos (supervivencia global y libre de recaída) con conclusiones controvertidas.

Existe una sistema de estadificación validado en población pediátrica con LLA para la clasificación del estado de compromiso de SNC basado en conteo celular por citología, presencia de blastos y naturaleza de la punción lumbar, que se relaciona con la probabilidad de supervivencia (Tabla 1) (5,70)

Tabla 1: Clasificación de riesgo de IL por CC

Clasificación	Linfoblastos en LCR	Conteo celular	Probabilidad de supervivencia a 5 años libre de leucemia en SNC	Probabilidad de supervivencia total a 5 años
SNC 1	Ninguno	Ninguno	96%	75%
SNC 2	Presente	<5	87%	49%
SNC 3	Presente o parálisis de nervio craneal	>0 = 5	74%	53%
Punción lumbar traumática con blastos *	Presente	Cualquiera		
*Punción lumbar traumática con eritrocitos > 10				
Modificado de (5)				

En particular, la mayoría de las recaídas del SNC se producen entre pacientes con SNC1, un pequeño número de leucocitos en el LCR en el momento del diagnóstico (SNC 2) ha sido un factor de riesgo controvertido.

Respecto a la relación de la positividad de CMF y supervivencia la evidencia es controvertida, existen estudios que apoyan que la afectación del SNC detectada solo por CMF está asociada con una mayor incidencia de recaídas y una menor supervivencia general, lo que sugiere que los pacientes con resultados positivos con este método podrían beneficiarse de una intensificación adicional de terapia sistémica y /o dirigida al SNC, sin embargo es relevante señalar que ninguna guía clínica actual apoya de manera concluyente este enfoque de tratamiento intensificado..

Un estudio reciente de 155 niños con LLA sin síntomas de compromiso de SNC, estudiados con muestras de LCR en paralelo con CC y CMF determinó el impacto pronóstico del recuento absoluto de células blásticas detectadas por CMF en LCR. En pacientes con más de 20 células leucémicas por 1 ml de LCR, la incidencia de recaída fue significativamente mayor en comparación con niños con resultados de CMF más bajos o negativos, el impacto pronóstico fue significativo e independiente del tipo de terapia dirigida al SNC (71), resultados que son similares a los encontrados en otros estudios (26,67,68).

Por otro lado, también hay evidencia que la afectación de SNC detectada solo por CMF en el momento del diagnóstico y negativa por CC no conduce a un mayor riesgo de recaída.

El ensayo MCR/ECOG realizado en adultos con LLA de novo reportó una incidencia de 5% de IL en 1508 pacientes, la edad, el conteo de leucocitos, el inmunofenotipo fue independientes en el análisis multivariado, la alteración inicial del SNC fue significativa solo para la supervivencia global ($p=0.03$) y no para supervivencia libre de eventos ($p= 0.06$). La supervivencia a 5 años fue 29% entre quienes desarrollaron IL en el diagnóstico comparado con 38% de los que no tuvieron IL (29)

El uso de CMF ha demostrado tener una disminución en la utilidad para evaluar muestras postquimioterapia. En un estudio de 990 muestras de LCR de 108 pacientes, 108 al diagnóstico y 882 en diferentes momentos de terapia intratecal, fueron evaluadas mediante CMF. Los pacientes con compromiso del SNC en el momento del diagnóstico (CMF+) mostraron predominantemente una LLA-T y mayores porcentajes de factores pronósticos negativos conocidos: grupo de alto riesgo, mayor recuento de glóbulos blancos, cariotipo

normal y fusión gen BCR-ABL. No se observaron diferencias en la supervivencia libre de recaída y la supervivencia general entre CMF+ vs CMF- en el momento del diagnóstico. Los pacientes con afectación del SNC durante la terapia mostraron una edad significativamente mayor, y mayores frecuencias de leucemia de células T. La detección de la enfermedad subclínica del SNC por parte de la CMF durante el mantenimiento se asoció con una supervivencia libre de recaída significativamente menor de 3 años y una supervivencia global de 3 años. Una metodología sensible como CMF se puede aplicar para seguimiento de LLA y puede identificar a un grupo de pacientes con alto riesgo de recaída. La CMF puede dar información de dos puntos importantes durante la terapia: tratamiento ineficaz o insuficiente y la carga de leucemia residual total corporal (30).

2.5 CC y CMF en LCR como guía en el tratamiento de compromiso de SNC en LLA

El manejo óptimo de la enfermedad del SNC en adultos con ALL sigue siendo incierto, no hay grandes ensayos clínicos aleatorios que evalúen diferentes estrategias de tratamiento, la mayoría de las decisiones terapéuticas han sido extrapoladas de guías del manejo de LLA en niños. Sigue siendo incierto si los pacientes que actualmente reciben el tratamiento de SNC1 y tienen blastos en el LCR identificado por CMF, se beneficiarán de la terapia intensificada dirigida al SNC o si el tratamiento dirigido al SNC puede reducirse en pacientes sin detección de compromiso en el SNC sin provocar más recaídas.

La mayoría de los regímenes de tratamiento combinan dosis múltiples de quimioterapia intratecal con altas dosis de metotrexato sistémico y / o Citarabina. La irradiación craneal es menos utilizada para profilaxis, pero sigue siendo el tratamiento más eficaz para la leucemia manifiesta del SNC.

Las terapias dirigidas al SNC causan varios efectos secundarios. La radioterapia craneal (RT) aumenta el riesgo de neoplasias secundarias, disfunciones neurocognitivas y endocrinas y deterioro del crecimiento. Ensayos recientes han omitido completamente RT, confiando en la quimioterapia intratecal (IT) y sistémica de altas dosis con buena penetración del SNC.

Las tasas de supervivencia a largo plazo en LLA infantil son actualmente superiores al 85% debido a avances en el tratamiento, sin embargo, el 15-20% de los niños todavía experimenta recaídas (72). Uno de los objetivos principales es continuar mejorando la supervivencia, atenuar las secuelas relacionadas con el tratamiento reduciendo su toxicidad, identificar y tratar de forma temprana las recaídas.

El uso de CC y CMF como método para evaluar el compromiso de SNC en LLA y guiar las decisiones terapéuticas basados en sus resultados es controversial y necesita ser interpretado acorde a las características del paciente y variables poblacionales específicas.

Los regímenes actuales incluyen tratamiento sistémico y profiláctico en SNC independiente del compromiso al diagnóstico. Hay estudios que apoyan que pacientes adultos y niños con resultados positivos en CMF, por la mayor incidencia de recaída y menor supervivencia global podrían beneficiarse de intensificar la terapia sistémica y de SNC, sin embargo no hay resultados concluyentes (19,68,73).

En un estudio prospectivo de LLA pediátrica, en donde se analizaron 1050 muestras de LCR, se encontró una mayor incidencia de recaídas en pacientes con CMF positiva al momento del diagnóstico y durante el tratamiento, pero no hubo significancia estadística, posiblemente por el bajo número de pacientes, se propone seguir evaluando la importancia clínica de los hallazgos de FC en el LCR en una cohorte más grande de pacientes, especialmente en casos de recidiva (53).

En otro estudio, en el día 15 de tratamiento, cinco de 52 pacientes (10%) tenían CMF en LCR positiva en el momento del diagnóstico, a pesar de al menos dos dosis semanales de tratamiento intratecal quimioterapia, concluyendo que se necesita un seguimiento más prolongado para aclarar si la positividad de la CMF tiene importancia pronóstica y es un indicador para la terapia intensificada dirigida al SNC (66).

3.Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la utilidad de la CMF en LCR al diagnóstico como predictora de supervivencia en adultos con LLA de precursores linfoides B en el INC entre marzo de 2013 y diciembre de 2018.

3.2 Objetivos específicos

- Describir las características sociodemográficas, clínicas y farmacológicas en la población de estudio.
- Describir la incidencia del compromiso de SNC en LLA de precursores linfoides B en adultos.
- Describir los valores absolutos de células malignas utilizados en CMF de LCR para definir IL en LLA de pre-B.
- Establecer la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con LLA de precursores linfoides B y su relación con los valores absolutos de la CMF en LCR.

4. Metodología

4.1 Tipo de investigación

El presente estudio es observacional analítico a partir de información retrospectiva, tipo cohorte histórica. Se tomaron los registros de datos de la historia clínica e informes de laboratorio de pacientes con LLA de precursores linfoides B entre marzo 2013 y diciembre de 2018 y se evaluó la asociación de los valores absolutos de la CMF en LCR con la supervivencia global y supervivencia libre de recaída.

4.2 Hipótesis:

No aplica por tratarse de un estudio observacional que da a conocer las características de la tipificación de la infiltración leptomeníngea mediante un medio de apoyo diagnóstico.

4.3 Sujetos del estudio

Los sujetos del estudio corresponden a adultos con LLA de precursores linfoides B confirmada por estudios de citometría de flujo en médula ósea y análisis morfológico, que tuvieron al menos un informe con los resultados de una muestra de LCR interpretable antes de recibir cualquier tipo de tratamiento intratecal y con información de los resultados de citometría de flujo en LCR, con una consulta de seguimiento en el INC y que recibieron tratamiento con intención curativa en el periodo comprendido entre Marzo del 2013 y Diciembre de 2018.

El muestreo se definió de tipo no probabilístico por conveniencia y se retomaron la totalidad de los casos presentes no descartados según los criterios de exclusión.

Se determinó el inicio de la recolección de datos a partir de 2013, tiempo en que en el INC se realizó el cambio de citómetro de flujo de 4 colores a 8 colores, haciendo posible a partir

de este momento la modificación de marcación de los inmunofenotipos, logrando reportar no solo el porcentaje de blastos en LCR sino también valores absolutos (principal variable a evaluar del estudio). Adicionalmente pacientes incluidos hasta diciembre de 2018, para que se cuente con al menos un año de seguimiento clínico.

Durante el año de proyección del estudio en un tiempo estimado de 3 meses, se revisaron por parte de las dos investigadoras 305 historias clínicas y reportes del análisis de LCR, con los resultados de CC y CMF en promedio 50 por cada año desde 2013 a 2018, de la siguiente manera:

Investigadora No 1: Revisión de historia clínica y datos de laboratorio en el periodo comprendido entre marzo de 2013 y diciembre 2015.

Investigadora No 2: Revisión de historia clínica y datos de laboratorio en el periodo comprendido entre enero 2016 y diciembre 2018.

4.4 Criterios de elegibilidad

4.4.1 Criterios de inclusión

- Adultos con diagnóstico de LLA precursores B confirmada por estudio de CMF en medula ósea y análisis morfológico.
- Pacientes con reporte de CMF en LCR con diagnóstico LLA precursores B.
- Pacientes que tengan una consulta de seguimiento en el INC, que hayan recibido tratamiento con intención curativa en el periodo comprendido entre Marzo del 2013 y Diciembre de 2018.

4.4.2 Criterios de exclusión

- Menores de 18 años
- Pacientes con crisis blásticas
- Pacientes con leucemia bifenotípica y linfoma linfoblástico.

Manejo de variables

Las variables indagadas fueron las de tipo sociodemográficas, tales como edad y sexo; variables clínicas de los principales factores pronósticos asociados a esta entidad: las variables de líquido cefalorraquídeo correspondientes a los reportes de citología convencional y citometría de flujo; las variables de tratamiento correspondieron a los esquemas usados en esta entidad.

Tabla 2. Categorización de variables			
Nombre	Definición	Tipo	Nivel operativo
Características generales			
1. RA	Número de historia clínica asignado en el INC que identifica el paciente	Cuantitativa continua	Números enteros
2. Fecha de nacimiento	Fecha de nacimiento del paciente definida como día/mes/año como consta en el documento de identidad o en el registro de la historia clínica	Cuantitativa ordinal	DD/MM/AAAA
3. Sexo	Condición sexual biológica del paciente	Cualitativa nominal	Hombre=0 Mujer=1
4. ECOG	Estado funcional por la escala del ECOG al ingreso. ECOG : (Eastern Cooperative Oncology Group)	Cualitativa ordinal	0=ECOG 0 1=ECOG 1 2=ECOG 2 3=ECOG 3 4=ECOG 4 5=ECOG 5
Características clínicas			
5. Fecha de diagnóstico	Fecha en la que se realizó el aspirado de médula ósea de donde se obtuvo la muestra que permitió confirmar el diagnóstico de LLA de precursores B [Control de procedimientos, nota en la historia clínica, o fecha de recepción de la muestra en el laboratorio de citometría de flujo]	Cuantitativa ordinal	DD/MM/AAAA

6. Inmunofenotipo	Linaje linfoide identificado mediante el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo en médula osea	Cualitativa nominal	1: Pro-B 2: Pre-B 3: Común 4: Sin clasificar
7. Recuento de leucocitos al diagnóstico	Recuento de leucocitos reportado en el primer hemograma disponible, antes de iniciar tratamiento, expresado en número de células/ul	Cuantitativa continua	Leucocitos en número de células/ul
8. Cariotipo al diagnóstico	Alteraciones genéticas numéricas y/o estructurales identificadas por citogenética convencional en médula osea	Cualitativa nominal	1: Normal 2: t(9;22) 3: t(4;11) 4: t(1;19) 5: t(12;21) 6: No crecimiento 7: Hipodiploidia baja (33-39) 8: Casi haploide (23-29) 9: Hipodiploidia alta (42-45) 10: Hiperdiploidia baja 11: Hiperdiploidia alta 12: Complejo (> o igual a 3 anormalidades) 13: Otro (Cual) _____ 14: Sin dato
9. Pruebas moleculares al diagnóstico	Alteraciones genéticas identificadas por técnicas moleculares al diagnóstico	Cualitativa nominal	1: Todas negativas 2: BCR/ABL p190 3: BCR/ABL p210 4: E2A/PBX1 5. MLL 6: No realizado
10. Compromiso extramedular diferente al SNC	Presencia de compromiso por enfermedad extramedular linfomatosa diferente a SNC definida por criterios clínicos o paraclínicos.	Cualitativa nominal	0: No 1: Si
11. En caso de afirmativo, cuales órganos fueron comprometidos	Presencia de compromiso por enfermedad extramedular linfomatosa diferente a SNC definida por criterios clínicos o paraclínicos.	Cualitativa nominal	1: Piel 2: Testículo 3: Riñón 4: Suprarenal 5: Páncreas 6: Retina 7: Mama 8: Pulmón 9: Hígado 10: Pleura 11: Peritoneo 12: Otro (Cual) _____

12. Compromiso clínico de sistema nervioso al diagnóstico	Registro en la historia clínica de síntomas que involucran sistema nervioso central o periférico al diagnóstico	Cualitativa nominal	0: No 1: Si
13. En caso de ser afirmativo, que síndrome clínico se presentó	Registro en la historia clínica de síntomas que involucran sistema nervioso central o periférico al diagnóstico	Cualitativa nominal	1: Neuropatía craneal 2: Alteración del estado de consciencia 3: Síndrome piramidal 4: Síndrome sensitivo 5: Mixto 6: Otro (cuál)
14. Tiempo entre diagnóstico de LLA a infiltración leptomenígea	Fecha en la que se diagnosticó compromiso de sistema nervioso por clínica o pruebas en LCR	Cuantitativa ordinal	1. DD/MM/AAAA 2. Sin dato
Muestra de LCR (tabla adjunta) ***			
Tratamiento			
22. Primera línea de tratamiento	Esquema de tratamiento usado al diagnóstico	Cualitativa nominal	1: HyperCVAD 2: GRAALL 2003 3: R-GRAALL 2003/05 4: CALGB 5: PINDA 6: PETHEMA 7: R-HyperCVAD 8: HyperCVAD + ITK 9: GRAAPH 2005 10: UKALL/ECOG 11: Otro/Cual_____
23. Fecha de inicio de la primera línea de tratamiento	Fecha de inicio del tratamiento de primera línea	Cuantitativa ordinal	DD/MM/AAAA
24. Número de terapias intratecales en ciclo de inducción	Número de terapia intratecal	Cuantitativa discreta	Número absoluto
25. Terapia Intratecal combinada	Administración de Metotrexate + citarabina intrateca o corticoide	Cualitativa nominal	0: No 1: Si
26. Remisión completa con la inducción	Remisión completa (RC): debe cumplir con todo lo siguiente: Si alcanzó o no remisión morfológica completa (recuperación en las tres líneas celulares sanguíneas), además de tener menos de 5% de blastos en aspirado de médula ósea y ausencia de leucemia extramedular.	Cualitativa nominal	0: No 1: Si
27. Fecha de remisión o falla de la inducción	Fecha de remisión completa (RC): debe cumplir con todo lo siguiente: Si alcanzó o no remisión morfológica completa (recuperación en las tres líneas celulares sanguíneas), además de tener menos de 5% de blastos en aspirado de médula ósea y ausencia de leucemia extramedular.	Cuantitativa ordinal	DD/MM/AAAA

28. Trasplante alogénico	Fue llevado a trasplante de progenitores hematopoyéticos	Cualitativa nominal	0: No 1: Si
29. Fecha de trasplante	Fecha en el que se realiza trasplante de progenitores hematopoyéticos	Cualitativa nominal	0: No 1: Si
30. Recaída	Reaparición de blastos en sangre periférica o en médula ósea >5% o en cualquier sitio extramedular después de alcanzar respuesta completa.	Cualitativa nominal	0: No 1: Si
31. Fecha de recaída o último contacto en remisión completa	Fecha en que se documenta la recaída o último contacto con el paciente en estado de remisión.	Cuantitativa ordinal	DD/MM/AAAA
32. Tipo de recaída	Sitio con resurgimiento de las células blásticas después de la remisión completa	Cualitativa nominal	1: Medular aislada 2: SNC aislado 3: Medular y SNC 4: Extramedular (diferente al SNC aislada) 5: Extramedular combinada con medular
33. Tratamiento de recaída en SNC (Aislada o combinada)	Tipo de tratamiento recibido en la recaída de SNC	Cualitativa nominal	1: Quimioterapia sistémica mas intratecales 2: Quimioterapia intratecal 3: Radioterapia 4: Quimioterapia sistémica única 5: Terapia paliativa
34. Muerte	Cese de funciones vitales del paciente	Cualitativa nominal	0: No 1: Si
35. Fecha de muerte o último contacto vivo	Fecha de muerte o último contacto vivo.	Cuantitativa ordinal	DD/MM/AAAA

4.5 Técnicas y procedimientos

La identificación de los pacientes se inició mediante la revisión de la base de datos del servicio de patología y de CMF del INC para identificar todos los casos de adultos con LLA precursores linfoides B en el periodo de estudio, una vez se contó con la autorización por parte del Comité de Investigación del INC.

A partir de esta revisión se identificaron los pacientes que tenían los informes de los resultados de CMF en LCR y que cumplían con las características de los criterios de inclusión definiendo la población.

Definida la población de estudio, se recopiló la información de los resultados tomados de los informes de laboratorio del LCR y de la CMF disponibles en los archivos del INC y en la historia clínica de cada paciente, el estado vital, fecha de muerte o último contacto vivo para hacer las estimaciones de la supervivencia y demás. Los informes fueron realizados por dos investigadoras de las especialidades de Medicina Interna y Neurología para una mayor fiabilidad en la recolección de la información y prevención de sesgos.

La información adicional requerida de los casos obtenidos a partir de los reportes del laboratorio Clínico, se lograron a partir de las revisiones de las historias clínicas correspondientes.

La información obtenida se ingresó en un instrumento de recolección de datos que contenía las variables a estudiar, y se validó a través de una prueba piloto, datos que de forma posterior se ingresaron y se corrieron en un programa estadístico para establecer los resultados y su análisis estadístico.

4.6 Recolección y procesamiento de datos

Los datos se organizaron mediante el orden secuencial por temporalidad del reporte. Se archivaron en el computador institucional del asesor del INC. Se almacenaron en la memoria física del computador del asesor del INC. Se administraron para su revisión y custodia por el asesor del INC. La información se extrajo del software del laboratorio clínico y del software hospitalario. La recopilación de la información se efectuó en un archivo del programa Excel®. El proceso estadístico se efectuó en el software RS.

5.8 Análisis de resultados

En el análisis univariado, las variables discretas se describieron mediante frecuencias y porcentajes; las variables continuas se describieron mediante medidas de tendencia central y de dispersión. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para identificar el tipo de distribución de las variables cuantitativas. Se eligió esta prueba porque se obtuvo más de 50 datos por cada variable. Para aquellas variables con distribución normal, se describió la media y su desviación estándar. Para las variables con distribución no normal, se describió la mediana y el rango intercuartil.

La incidencia acumulada del compromiso de SNC en adultos con LLA de precursores linfoides B, definido como síntomas o signos neurológicos de inicio reciente atribuidos a LLA confirmado por citología (presencia de blastos > 5 WBC/uL en LCR o síntomas) o positividad en LCR por citometría de flujo se determinó según los casos encontrados. Como la población es dinámica, es decir, a lo largo del periodo de observación ingresan en la cohorte nuevos casos, el cálculo de la incidencia acumulada fue igual al número de pacientes con compromiso en SNC a lo largo del periodo de observación dividido el promedio de la población sin compromiso en SNC al inicio y final del periodo de observación.

El análisis de supervivencia global definido como tiempo desde el momento del diagnóstico, hasta el momento de muerte por cualquier causa o del último control y supervivencia libre de enfermedad definido como tiempo desde la remisión completa hasta el momento de la recaída, se realizó mediante la curva de Kaplan-Meier.

Los valores positivos de CMF de LCR se mostraron en cuartiles y mediante un gráfico de dispersión de puntos. Esto contribuyó a determinar y visualizar los puntos de corte que divide en cuatro partes iguales a la población con IL. Con estos puntos de corte se clasificó posteriormente a la población para la categorización de la población en el análisis de supervivencia. Se decidió utilizar este método para la selección de puntos de corte porque garantiza que en cada subgrupo haya un número suficiente de personas para el análisis.

Para determinar la asociación entre los valores de CMF en LCR al momento del diagnóstico y la supervivencia global y libre de enfermedad de la población se calculó las funciones de supervivencia para cada subgrupo según los puntos de corte seleccionados en el punto anterior. Se utilizó la prueba de Mantel-Cox para determinar diferencias entre las funciones. Como variables dependientes se tomó la mortalidad y la recaída. Para cada una de las variables dependientes se estimó el tiempo al evento y se analizó de forma separada. Adicionalmente, para cada variable dependiente se construyó un modelo de riesgos proporcionales de Cox para valorar el efecto de covariables sociodemográficas y clínicas potencialmente relacionadas.

Todas las pruebas estadísticas tienen un intervalo de confianza del 95% y un error alfa de 0,05.

4.9 Control de sesgos

Los sesgos de selección se controlaron mediante el enfoque de identificación de los criterios de exclusión en cada caso. Los sesgos de información se controlaron mediante el registro por parte de dos investigadoras con un solo instrumento de recolección de datos, el cual para cada variable dicotómica o politómica se contó con un mecanismo único de selección para cada ítem. Algunas características de los pacientes potencialmente pueden generar confusión con los resultados, como las demográficas y los antecedentes clínicos. Estos sesgos de confusión se controlaron mediante el ajuste de variables en el análisis multivariado.

5.Consideraciones éticas

Este protocolo de investigación se realizó bajo las condiciones estipuladas en la Declaración de Helsinki y por el Ministerio de Salud de la República de Colombia mediante la Resolución número 8430 de 1993. De igual forma, se desarrolló de acuerdo con los principios éticos del Reporte Belmont de respeto, dignidad, autonomía, justicia, no maleficencia y beneficencia.

Esta investigación está clasificada como Investigación sin riesgo como lo dicta el Artículo 11 de la Resolución número 8430 de 1993 del Ministerio de Salud: “Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta”.

Para garantizar la protección de la privacidad de los sujetos de investigación y la confidencialidad de la información, se utilizaron códigos o números para cada paciente, que le haga no identificable en la investigación. Nunca se publicaron ni se divulgaron a través de ningún medio los nombres de las participantes. El tratamiento y protección de datos se llevó a cabo siguiendo los principios de la Ley 1581 de 2012.

Dado que no se necesita de la intervención en seres humanos, no se requirió del diligenciamiento de la autorización de la participación mediante consentimiento informado.

El desarrollo de la investigación requirió de la previa autorización del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia

(Sede Bogotá), así como también del Comité de Ética e Investigación del INC. Todas las actividades del proyecto iniciaron únicamente cuando se contó con la respuesta del Comité de Ética del Instituto Nacional de Cancerología.

No existe ningún conflicto de interés en el desarrollo de este estudio por parte de los investigadores.

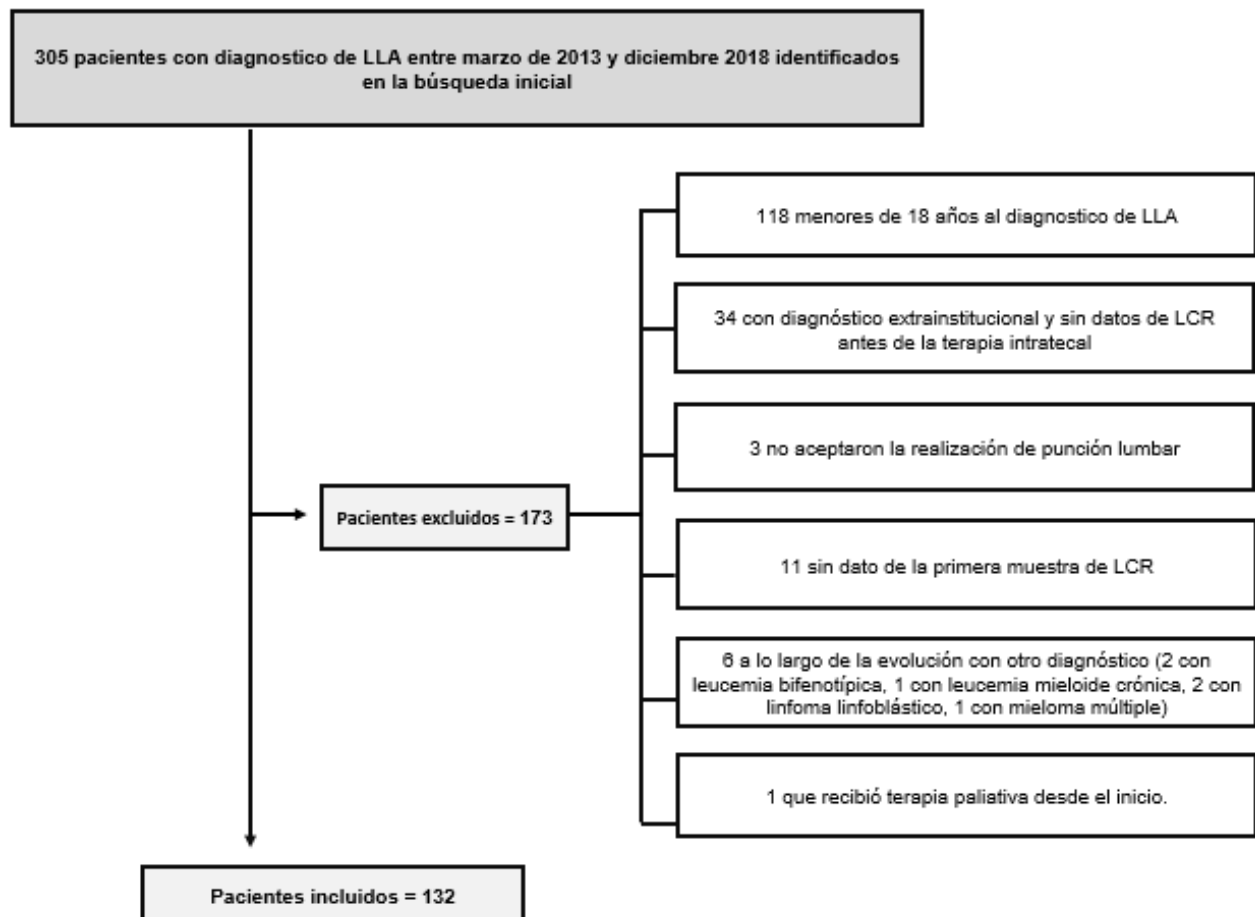
6.Resultados

6.1 Recolección de la información

Se realizó una búsqueda activa a través del registro de pacientes del INC con diagnóstico confirmado de LLA de precursores linfoides B que tuvieron al menos una muestra de líquido cefalorraquídeo con datos disponibles de citometría de flujo y citología.

Se identificaron en la búsqueda inicial 305 pacientes con este diagnóstico y recibieron tratamiento entre marzo de 2013 y diciembre de 2018. Se excluyeron 173 casos distribuidos así (ver gráfico 1): 118 pacientes menores de 18 años cuando fueron diagnosticados con LLA; 34 pacientes con diagnóstico extrahospitalario e inicio de tratamiento sin información de muestra de LCR antes de la administración de terapia intratecal; 3 pacientes no aceptaron la realización de punción lumbar; 11 pacientes no tenían dato de la primera muestra de LCR; 6 diagnosticados con otra entidad (2 leucemia bifenotípica, 1 leucemia mieloide crónica, 2 linfoma linfoblástico, 1 mieloma múltiple) y 1 recibió terapia paliativa desde el diagnóstico.

Al finalizar, luego de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, ingresaron al análisis del estudio 132 pacientes (ver gráfico 1).

Gráfico 1. Diagrama de inclusión de pacientes

6.2 Análisis descriptivo

6.2.1 Características clínicas y de tratamiento

Características clínicas y de laboratorio al momento de la presentación

En el periodo comprendido entre marzo de 2013 a diciembre de 2018, 132 pacientes: 70 hombres y 62 mujeres con diagnóstico de LLA de precursores linfoides B mayores a 18 años, recibieron tratamiento y tenían datos disponibles de citometría de flujo y citología en LCR, así como datos del seguimiento clínico. La mediana de edad en la cohorte fue de 34 años con un (RIC 21.25); en la cohorte de individuos hombres la mediana de edad fue de 33.21 y en mujeres 38.02.

Mediante la evaluación por ECOG se encontró que 15.2 % de la cohorte tuvieron un ECOG 0; 40.9 % con ECOG 1; 38.6 % con ECOG 2; 4.5 % con ECOG 3 y 1 paciente con ECOG 4.

En la clasificación de LLA de precursores linfoides B por inmunofenotipo tomada de los registros de CMF de médula ósea, la distribución de los casos fue: 51.5% en tipo común, 2.3% pre-B, 1.5% pro-B y 44.7% sin clasificar.

Todos los pacientes contaban con un cuadro hemático antes de recibir cualquier tipo de tratamiento, con un promedio de recuento de leucocitos al diagnóstico de 55238.24 c/μl (DE 99451.34). De acuerdo con el género, la mediana del conteo de leucocitos fue de 57190.71 c/μl en hombres y 53033.84 c/μl en mujeres.

Para identificar los pacientes con compromiso extramedular diferente a SNC definido como la presencia de manifestaciones clínicas, anormalidad en estudios de apoyo diagnóstico imagenológico y confirmación histopatológica de infiltración leucémica, se encontró que 3.8% tuvieron compromiso de los siguientes órganos: riñón, glándula suprarrenal, piel, hígado y páncreas. (ver tabla 3).

Linfoblástica Aguda de precursores linfoides B

Tabla 3. Características generales de la población

	Total	Hombre	Mujer
Población total	132	70	62
ECOG ¹ n (%)			
ECOG 0	20 (15.2)	10 (14.3)	10 (16.1)
ECOG 1	54 (40.9)	29 (41.4)	25 (40.3)
ECOG 2	51 (38.6)	25 (35.7)	26 (41.9)
ECOG 3	6 (4.5)	5 (7.1)	1 (1.6)
ECOG 4	1 (0.8)	1 (1.4)	0 (0.0)
Edad (mediana (RIC))	35.47 (13.51)	33.21 (12.28)	38.02 (14.47)
Inmunofenotipo n (%)			
Común	68 (51.5)	40 (57.1)	28 (45.2)
Pre-B	3 (2.3)	1 (1.4)	2 (3.2)
Pro-B	2 (1.5)	1 (1.4)	1 (1.6)
Sin clasificar	59 (44.7)	28 (40.0)	31 (50.0)
Leucocitos al diagnóstico (mediana c/μl² (RIC))	55238.24 (99451.34)	57190.71 (99993.00)	53033.84 (99605.20)
Cariotipo n (%)			
Complejo ³	3 (2.3)	2 (2.9)	1 (1.6)
Hiperdiploidia alta ⁴	4 (3.0)	1 (1.4)	3 (4.8)
Hipodiploidia alta ⁵	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (1.6)
No crecimiento	22 (16.7)	10 (14.3)	12 (19.4)
Normal	59 (44.7)	29 (41.4)	30 (48.4)
Otro ⁶	17 (12.9)	10 (14.3)	7 (11.3)
Sin dato	11 (8.3)	10 (14.3)	1 (1.6)
t(9;22)	15 (11.4)	8 (11.4)	7 (11.3)
Pruebas moleculares n (%)			
BCR/ABL p190	18 (13.6)	11 (15.7)	7 (11.3)
BCR/ABL p210	4 (3.0)	2 (2.9)	2 (3.2)
E2A/PBX1	1 (0.8)	1 (1.4)	0 (0.0)
No realizado	9 (6.8)	5 (7.1)	4 (6.5)
Todas negativas	100 (75.8)	51 (72.9)	49 (79.0)
Compromiso extramedular diferente a SNC ⁷ n (%)	5 (3.8)	3 (4.3)	2 (3.2)
Compromiso clínico de SNC al diagnóstico ⁸ n (%)	8 (6.1)	4 (5.7)	4 (6.5)

¹ **estado funcional por escala ECOG** (Eastern Cooperative Oncology Group) ECOG 0: asintomático ECOG 1: síntomas que impiden realizar trabajos arduos ECOG 2: no es capaz de desempeñar ningún trabajo ECOG 3: paciente en cama más de la mitad del día ECOG 4: ayuda en todas las actividades de la vida diaria. ² células por microlitro

³ **complejo**: > o igual a 3 anormalidades ⁴ **Hiperdiploidia alta**: células leucémicas con 51-65/67 cromosomas ⁵ **Hipodiploidia alta** 42 a 45 cromosomas

⁶ **otro cariotipo** corresponde a: trisomía cromosómica; anormal 46XX-T(X); hiperdiploidia no especificada; anormal 47XY,+MAR; hiperdiploide cercano a la triploidia, 46 XX,T (14;19); hiperdiploide sin número de cromosomas analizados; 47XX+? sin catalogar el origen del cromosoma extra; anormal tetraploide con rearrreglos complejos; 46XY delección del brazo largo del cromosoma 6; 46 XX; traslocación 9;22 (Q34;Q11), 9p- [15]46 XX 25; 45 XY, tetraploide en 60% de células; delección brazo largo cromosoma X; trisomía del cromosoma 21 en el 40% de metafases; alteración estructural del cromosoma 9; alteración estructural del cromosoma 1.

⁷ **compromiso extramedular diferente a SNC incluyó**: piel, riñón, suprarrenal, pleura, hígado.

⁸ **compromiso clínico del SNC al diagnóstico**: definido por signos o síntomas que involucran el sistema nervioso consignados en la historia clínica de ingreso.

Características genéticas y moleculares

En la revisión de los estudios de citogenética se encontró que el 44.7 % de los cariotipos eran normales; 30.4% pacientes tenían cariotipos anormales, siendo la t(9;22) la anormalidad citogenética más frecuentemente encontrada, correspondiente al 11.4% ; en el 16.7 % de los cariotipos no se obtuvo crecimiento y en el 8.3% no se encontró dato. Respecto al resultado de las pruebas moleculares, el 75.8% fueron negativas y de las pruebas positivas 13.6% fueron BCR/ABL p190 positivo; 3% BCR/ABL p210 positivo y un paciente con E2A/PBX1 positiva; en 6.8% de los pacientes no se realizaron pruebas moleculares (ver tabla 3)

Se muestran en la tabla 4 datos cruzados entre cariotipo y pruebas moleculares, resaltando que 22 pacientes tuvieron cromosoma de Philadelphia positivo: 15 detectados por cariotipo y 7 por pruebas moleculares; 18 tenían BCR/ABL p190 positiva y 4 BCR/ABL p210.

Tabla 4. Distribución de cariotipo y pruebas moleculares						
Cariotipo n (%)	Pruebas moleculares n (%)					
	BCR/ABL p190	BCR/ABL p210	E2A/PBX1	No realizado	Todas negativas	Total
Complejo ¹	1 (33.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (66.7%)	3 (100%)
Hiperdiploidia alta ²	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (100%)	4 (100%)
Hipodiploidia alta ³	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100%)	1 (100%)
No crecimiento	1 (4.5%)	1 (4.5%)	0 (0.0%)	1 (4.5%)	19 (86.4%)	22 (100%)
Normal	3 (5.1%)	0 (0.0%)	1 (1.7%)	5 (8.5%)	50 (84.7%)	59 (100%)
Otro ⁴	1 (5.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (5.9%)	15 (88.2%)	17 (100%)
Sin dato	4 (36.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	7 (63.6%)	11 (100%)
t (9;22)	8 (53.3%)	3 (20.0%)	0 (0.0%)	2 (13.3%)	2 (13.3%)	15 (100%)
Total	18 (13.6%)	4 (3.0%)	1 (0.8%)	9 (6.8%)	100 (75.8%)	132 (100%)

Nota: Se presentan los datos de cariotipo y pruebas moleculares, el porcentaje total corresponde a las filas.
¹ **complejo**: > o igual a 3 anormalidades ² **hiperdiploidia alta**: células leucémicas con 51-65/67 cromosomas ³ **hipodiploidia alta** 42 a 45 cromosomas
⁴ **Otro cariotipo** corresponde a: trisomía cromosómica; anormal 46XX-T(X); hiperdiploidia no especificada; anormal 47XY,+MAR; hiperdiploide cercano a la triploidia, 46 XX,T (14;19); hiperdiploide sin número de cromosomas analizados; 47XX+? sin catalogar el origen del cromosoma extra; anormal tetraploide con rearrreglos complejos; 46XY delección del brazo largo del cromosoma 6; 46 XX; traslocación 9;22 (Q34;Q11), 9p- [15]46 XX 25; 45 XY, tetraploide en 60% de células; delección brazo largo cromosoma X; trisomía del cromosoma 21 en el 40% de metafases; alteración estructural del cromosoma 9; alteración estructural del cromosoma 1.

En un análisis exploratorio correlacionando el cariotipo con otras variables de importancia clínica se encontró que los pacientes con t(9;22) tuvieron una mediana más alta de leucocitos en la presentación de la enfermedad y una edad mayor (ver tabla 5).

Tabla 5. Cariotipo, leucocitos y número de terapias intratecales			
Cariotipo	Leucocitos c/ μ l ¹ (mediana)	Edad (mediana)	Intratecales (mediana)
Complejo ²	50220	34	3
Hiperdiploidia alta ³	48112	30.5	2
Hipodiploidia alta ⁴	9880	19	1
No crecimiento	29892	36	1
Normal	62814	33	2
Otro ⁵	33007	33	3
Sin dato	41333	31	2
t (9;22)	103937	42	1
¹ células por microlitro ² complejo: > o igual a 3 anormalidades ³ hiperdiploidia alta: células leucémicas con 51-65/67 cromosomas ⁴ hipodiploidia alta 42 a 45 cromosomas ⁵ Otro cariotipo (descritos en tabla 3)			

Características del tratamiento

Respecto al tratamiento de primera línea, los tres esquemas más usados en la cohorte fueron: 37.1% recibieron terapia con GRAALL 2003; seguido de 25% con HyperCVAD y 8,3% con R-HyperCVAD (ver tabla 6)

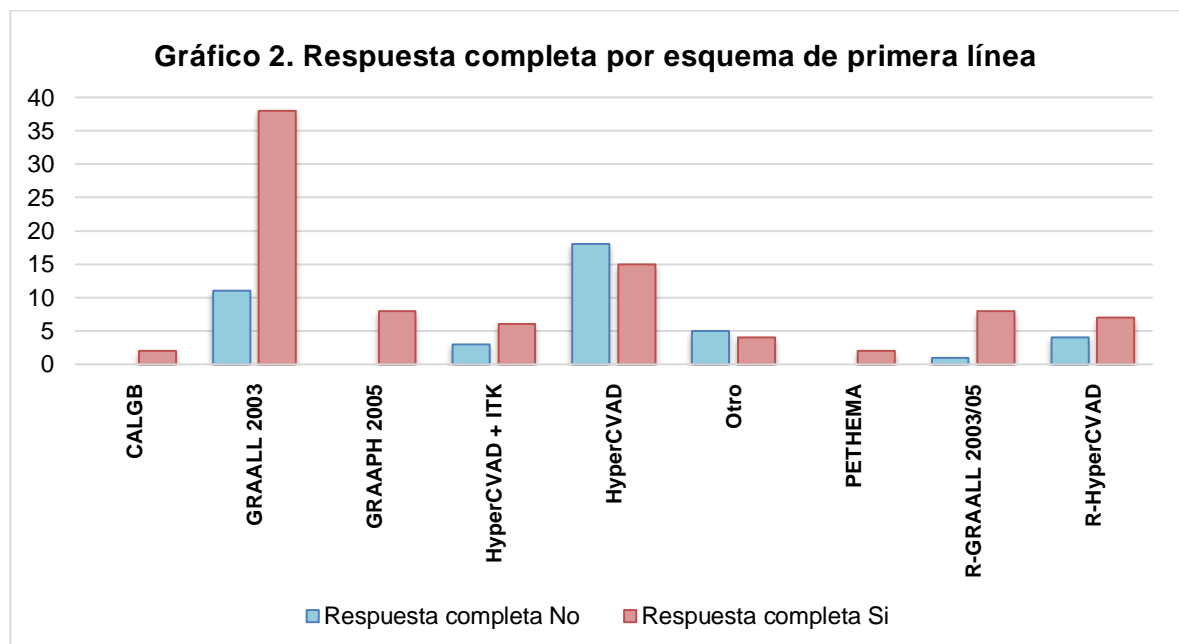
Tabla 6. Esquemas de tratamiento			
	Todos	Hombres	Mujeres
Población total	132	70	62
Tratamiento de primera línea n (%)			
CALGB	2 (1.5)	0 (0.0)	2 (3.2)
GRAALL 2003	49 (37.1)	27 (38.6)	22 (35.5)
GRAAPH 2005	8 (6.1)	3 (4.3)	5 (8.1)
HyperCVAD + ITK ¹	9 (6.8)	7 (10.0)	2 (3.2)
HyperCVAD	33 (25.0)	13 (18.6)	20 (32.3)
Otro	9 (6.8)	7 (10.0)	2 (3.2)
PETHEMA	2 (1.5)	0 (0.0)	2 (3.2)
R-GRAALL 2003/05	9 (6.8)	5 (7.1)	4 (6.5)
R-HyperCVAD	11 (8.3)	8 (11.4)	3 (4.8)
¹ ITK: Inhibidor de la Tirosin Kinasa			

En el análisis exploratorio del tratamiento respecto a edad, leucocitos y terapia intratecal se muestra en la tabla 7

Tabla 7. Leucocitos, edad e intratecales según tratamiento de primera línea			
Tratamiento de primera línea (%)	Leucocitos c/ μ l ¹ (mediana)	Edad (mediana)	Intratecales (mediana)
CALGB	30155	55	1.5
GRAALL 2003	42866	27	2
GRAAPH 2005	77405	42.5	4.5
HyperCVAD + ITK	107280	38	1
HyperCVAD	44980	45	2
Otro	26174	21	2
PETHEMA	3640	33	1.5
R-GRAALL 2003/05	131704	39	3
R-HyperCVAD	57585	28	1
¹ células por microlitro			

Respuesta al tratamiento

Respecto al comportamiento de la cohorte en términos de respuesta al tratamiento, de los pacientes que recibieron GRAAL 2003 (49 pacientes) 38 tuvieron respuesta completa con la inducción, en el segundo tratamiento más recibido que fue HyperCVAD (33 pacientes) 15 lograron respuesta completa. (Gráfico 2)



En la tabla 8 se observa que el 81% de los pacientes recibió combinación de terapia intratecal en la inducción, el 68,18% tuvo remisión completa, 14,39% tuvo trasplante alogénico y 57,58% tuvo recaída. Los tipos de recaída más frecuente fue medular aislada en el 56,58% y medular-SNC en el 18,74%.

Tabla 8. Variables de importancia en el tratamiento			
Variable	Categoría	n	%
Quimioterapia intratecal combinada ¹		107	81,06
Remisión completa		90	68,18
Trasplante alogénico		19	14,39
Tiempo de trasplante (C2, RIC)		12,09	6,42
Recaída		76	57,58
Tipo de recaída	Medular aislada	43	56,58
	Medular y SNC ²	15	19,74
	SNC aislado	11	14,47
	Extramedular y medular	4	5,6
	Extramedular	3	3,95
¹ quimioterapia intratecal combinada: administración de metotrexate + Citarabina ² SNC: Sistema Nervioso Central RIC: rango intercuartilico.			

6.3 Compromiso del sistema nervioso

6.3.1 Compromiso clínico de sistema nervioso al diagnóstico

Los pacientes que tuvieron compromiso clínico del sistema nervioso al diagnóstico se identificaron mediante la revisión de la primera historia clínica tomando aquellos casos con manifestaciones neurológicas y hallazgos al examen físico que permitieron agrupar a los pacientes en grandes síndromes, encontrando que el 6.1% tenían compromiso clínico del sistema nervioso al diagnóstico de la enfermedad, distribuidos de la siguiente manera: 3 pacientes con síndrome piramidal; 1 paciente con alteración del estado de conciencia; 1 paciente con neuropatía craneal; 1 paciente con síndrome sensitivo; 1 paciente con compromiso mixto y 1 paciente con otro tipo de compromiso que correspondió a síndrome convulsivo (ver tabla 9).

Tabla 9. Compromiso clínico del sistema nervioso			
	Todos	Hombre	Mujer
Población total	132	70	62
Compromiso clínico del SN al diagnóstico n (%)	8 (6.1)	4 (5.7)	4 (6.5)
Síndrome clínico n (%)			
Alteración del estado de conciencia	1 (0.8)	1 (1.4)	0 (0.0)
Mixto ¹	1 (0.8)	1 (1.4)	0 (0.0)
Neuropatía craneal	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (1.6)
Otro ²	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (1.6)
Síndrome piramidal	3 (2.3)	2 (2.9)	1 (1.6)
Síndrome sensitivo	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (1.6)
Intratecales en la inducción (mediana (RIC))	2 (2)	2 (2)	2 (2)
¹ <i>mixto</i> : presentación de más de 1 síndrome. ² <i>otro</i> : síndrome convulsivo.			

De los 8 pacientes con compromiso clínico del sistema nervioso al diagnóstico, 4 fueron hombres y 4 mujeres; la mediana de edad fue de 42.2 y la mediana de leucocitos de 2620 c/μl. Respecto a la terapia intratecal en la inducción la mediana fue de 2; 1 paciente no recibió terapia intratecal, 3 pacientes recibieron 1 intratecal, 2 pacientes 2 intratecales, 1 paciente 4 y 1 paciente 6 intratecales y (ver tabla 10).

Tabla 10. Edad y numero de terapias intratecales según compromiso del SNC			
Compromiso del SNC	Edad (mediana)	Leucocitos c/μl ¹ (mediana)	No de Intratecales (mediana)
No	35	12575	2
Si	42.2	2620	2
¹ células por microlitro SN: Sistema nervioso			

Entre otras características del tratamiento y recaída, 4 pacientes recibieron esquema GRAAL 2003, 7 de los 8 pacientes tuvieron respuesta completa con el esquema de inducción, 5 tuvieron recaída 2 extramedular combinada, 2 medular aislada y solo una en SNC aislado, 7 pacientes murieron, solo un paciente tuvo citología positiva y dos pacientes tuvieron citometría positiva con blastos en 7,7 y 0,2

6.3.2 Compromiso del sistema nervioso por CMF y CC de LCR al diagnóstico

En la revisión de historias clínicas tanto al diagnóstico como en el seguimiento en esta cohorte se encontró que el compromiso de sistema nervioso por estudios de LCR fue definido como cualquier valor positivo de citometría de flujo y/o positividad en citología independiente de si se encontraba o no compromiso clínico neurológico. Se describen a continuación los resultados de la primera CMF y CC en LCR al momento de la presentación de LLA, resaltando que estas muestras fueron obtenidas antes de recibir cualquier tipo de terapia intratecal en el ciclo de inducción.

En la tabla 11 se encuentra que el 84,8% de las citologías fueron interpretables, de las cuales el 14,29% fueron positivas. El 99,21% de las citometrías fueron interpretables, de las cuales 25,4% fueron positivas, con una mediana de 0,835 valor absoluto de blastos/ μ l; 12 pacientes tuvieron citología y citometría positiva. El 16,67% de las punciones fueron traumáticas y en el 90.9% de las muestras se utilizó Transfix como solución estabilizante.

Tabla 11. Resultados de citometría de flujo y citología de LCR al diagnóstico			
Variable	Categoría	N	%
Citología interpretable		112	84,8
Resultado citología	Positivo	16	14,29
	Negativo	96	85,71
Citometría interpretable		126	99,21
Resultado citometría	Positivo	32	25,4
	Negativo	94	74,6
Resultado citometría (C2, RIC)		0,835	3,617
Punción lumbar traumática		22	16,67
Uso de Transfix		120	90.9%
C2: Segundo cuartil, RIC: Rango intercuartílico			

De los pacientes con resultado positivo en la citología, 4 (25%) tuvieron una punción lumbar traumática y 12 (75%) no fue traumática. De los pacientes con resultado positivo en la citometría, 8 (25%) tuvieron una punción lumbar traumática y 24 (75%) no tuvieron una punción traumática (Ver tabla 12)

Tabla 12. CC y CMF en LCR con punciones lumbares traumáticas

Variable	Categoría	Punción lumbar traumática				Total
		Si		No		
		N	%	n	%	
Resultado citología	Positiva	4	25	12	75	16
	Negativa	16	16,7	80	83,3	96
Resultado citometría de flujo	Positiva	8	25	24	75	32
	Negativa	12	12,8	82	87,2	94

CC: citología convencional **CMF:** citometría de flujo **LCR:** líquido cefalorraquídeo

Se realizó un análisis de concordancia entre el resultado de la citología y la citometría de flujo con un valor de Kappa de 0,49 el cual es moderado, estadísticamente significativo (Ver tabla 13)

Tabla 13. Concordancia entre CC y CMF

N	Kappa	IC 95%		P
		Lim inf	Lim sup	
106	0,49	0,43	0,56	0,000

CC: citología convencional CMF: citometría de flujo

En la tabla 14 se observa que de los pacientes con resultado positivo en la citología 1 (6,2%) tuvo compromiso del SNC y 15 (93,8%) no tuvo compromiso del SNC. De los pacientes con resultado positivo en la citometría de flujo, 2 (6,2%) tuvo compromiso del SNC y 30 (93,6%) no tuvo compromiso.

Tabla 14. CC y CMF en relación con compromiso clínico de SN

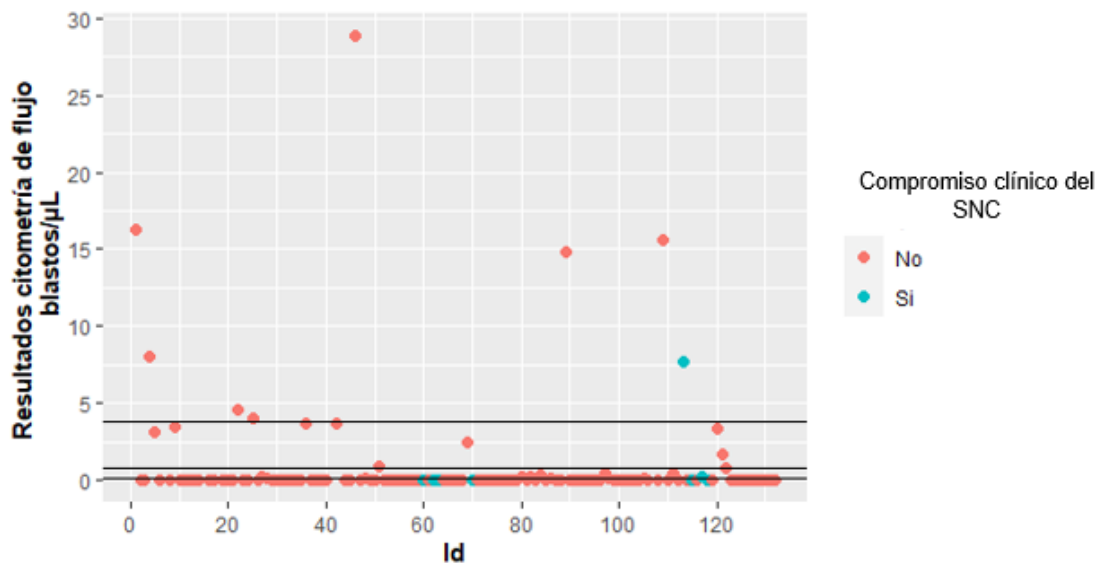
Variable	Categoría	Compromiso del SN				Total
		Si		No		
		N	%	n	%	
Resultado citología	Positiva	1	6,2	15	93,8	16
	Negativa	6	6,2	90	93,8	96
Resultado citometría	Positiva	2	6,2	30	93,6	32
	Negativa	6	6,4	88	93,8	94

CC: citología convencional CMF: citometría de flujo SN: sistema nervioso

La mediana de blastos/ μ l en la citometría en los pacientes con compromiso clínico del sistema nervioso al diagnóstico fue de 3,95 blastos/ μ l (RIC 3,7 blastos/ μ l) y de los pacientes sin compromiso clínico del SN al diagnóstico fue de 0,84 blastos/ μ l (RIC 3,56 blastos/ μ l).

Se presenta en el gráfico 3 la distribución de los valores de la primera citometría de flujo en LCR al diagnóstico antes de recibir cualquier tipo de tratamiento intratecal y se discriminan según el compromiso clínico del SNC al diagnóstico.

Gráfico 3. Distribución del valor de blastos/ μ l en CMF de LCR al diagnóstico



Las líneas corresponden a los cuartiles

C1 = 0,165 blastos/ μ l	El 25% de los datos tuvo un valor menor a este
C2 = 0,835 blastos/ μ l	El 50% de los datos tuvo un valor menor a este
C3 = 3,782 blastos/ μ l	El 75% de los datos tuvo un valor menor a este
C4 = 28,9 blastos/ μ l	El 100% de los datos tuvo un valor menor a este

El valor mínimo encontrado de positividad por citometría de flujo fue de 0.03 blastos/ μ l, este paciente tuvo citología negativa y el valor máximo fue de 28,9 blastos/ μ l con citología positiva.

En la tabla 15 se observa que en los pacientes masculinos el 24,2% tuvo resultado de citometría positivo. De los pacientes con ECOG 0 el 38,9% tuvo citometría positiva, al igual que el 28,6% de ECOG 1 y el 16,7% de ECOG 2. El número de leucocitos en los pacientes con citometría positiva tuvo una mediana de 3790 (RIC 77520). Los pacientes con inmunofenotipo común tuvieron citometría positiva en el 27,7%, sin clasificar en el 23.2%

y Pre-B en el 33,3%. Los pacientes con cariotipo normal tuvieron citometría positiva en el 19,3%, y en los de inmunofenotipo t(9;22) fue positivo en el 42,9%. Los pacientes con pruebas moleculares positivas para BCR/ABL p190 tuvieron citometría positiva en el 44,4%. Ninguno con compromiso de órganos diferentes al SNC tuvo positiva la citometría. El 25% de los pacientes con compromiso del SNC tuvo citometría positiva.

Tabla 15. Caracterización de pacientes con CMF positiva al diagnóstico						
Variable	Categoría	Citometría				Total
		Positiva		Negativa		
		n	%	N	%	
Sexo	Hombre	16	24,2	50	75,8	66
	Mujer	16	26,7	44	73,3	60
ECOG	0	7	38,9	11	61,1	18
	1	16	29,6	38	70,4	54
	2	8	16,7	40	83,3	48
	3	1	20	4	80	5
	4	0	0	1	100	1
Numero de leucocitos al diagnostico	C2, RIC	37590	77520	6425	44692	126
Inmunofenotipo	Común	18	27,7	47	72,3	65
	Sin clasificar	13	23,2	43	76,8	56
	Pre-B	1	33,3	2	66,7	3
	Pro-B	0	0	2	100	2
Cariotipo	Normal	11	19,3	46	80,7	57
	Otro	6	37,5	10	62,5	16
	t(9;22)	6	42,9	8	57,1	14
	Sin dato	5	45,5	6	54,5	11
	No crecimiento	3	15	17	85	20
	Hiperdiploidia alta	1	25	3	75	4
	Complejo (≥3 anormalidades)	0	0	3	100	3
	Hipodiploidia alta (42-45)	0	0	1	100	1
Pruebas moleculares	Todas negativas	22	23,2	73	76,8	95
	BCR/ABL p190	8	44,4	10	55,6	18
	No realizado	2	25	6	75	8
	BCR/ABL p210	0	0	4	100	4
	E2A/PBX1	0	0	1	100	1
Compromiso de órganos diferentes al SNC	Si	0	0	5	100	5
	No	32	26,4	89	73,6	121
Compromiso del SN	Si	2	25	6	75	8
	No	30	25,4	88	74,6	118
SN: Sistema Nervioso Central, C2: Mediana, RIC: Rango intercuartílico						

En la tabla 16 se observa que de los pacientes con tratamiento HyperCVAD tuvieron citometría positiva el 26,7% y de los del tratamiento GRAAPH2005 el 62% tuvo citometría positiva.

De los pacientes que recibieron terapia intratecal, el 25,8% tuvo citometría positiva. El promedio de terapias intratecales fueron 3,15 (+/-2,11). De los pacientes con remisión

incompleta el 24,3% tuvo citometría positiva. De los pacientes con trasplante el 77,8% tuvo citometría positiva. De los pacientes con recaída el 28,9% tuvo citometría positiva.

Tabla 16. Caracterización de resultados de CMF y tratamiento						
Variable	Categoría	Citometría				Total
		Positiva		Negativa		
		N	%	n	%	
Tipo de tratamiento	HyperCVAD	8	26,7	22	73,3	30
	GRAAPH 2005	5	62,5	3	37,5	8
	GRAALL 2003	4	8,3	44	91,7	48
	R-GRAALL 2003/05	4	44,4	5	55,6	9
	R-HyperCVAD	4	40	6	60	10
	HyperCVAD + ITK	3	37,5	5	62,5	8
	Otro	2	22,2	7	77,8	9
	CALGB	1	50	1	50	2
	PETHEMA	1	50	1	50	2
Intratecal	Si	32	25,8	92	74,2	124
	No	0	0	2	100	2
Numero de terapias intratecales	Media (DE)	3,15	2,11	1,79	1,06	126
Remisión	Incompleta	9	24,3	28	75,7	37
	Completa	23	25,8	66	74,2	89
Trasplante	Si	4	77,8	14	22,2	18
	No	28	74,1	80	25,9	108
Recaída	Si	22	28,9	54	71,1	76
	No	10	20	40	80	50
DE: Desviación estándar						

La incidencia acumulada del compromiso de SNC en adultos con LLA de precursores linfoides B, definido como síntomas o signos neurológicos de inicio reciente atribuidos a LLA confirmado por citología (presencia de blastos > 5 WBC/uL en LCR o síntomas) o positividad en LCR por citometría de flujo se determinó según los casos encontrados. Para efectos de este estudio se definió la tasa de incidencia acumulada del compromiso del Sistema Nervioso Central (CoSNC) como:

Tasa de incidencia por compromiso clínico

$$Tasa\ de\ incidencia\ CoSNC = \frac{Numero\ de\ pacientes\ con\ LLA\ y\ Compromiso\ del\ SNC}{Población\ con\ diagnóstico\ de\ LLA}$$

$$Tasa\ de\ incidencia\ CoSNCe = \frac{Numero\ de\ pacientes\ con\ LLA\ y\ Compromiso\ del\ SNCe}{Población\ con\ diagnóstico\ de\ LLA}$$

En la tabla 17 se observa que la incidencia total fue de 6,1 casos de compromiso de SNC por cada 100 pacientes diagnosticados con LLA. La incidencia por citometría y

citología al diagnóstico fue de 1,5 y 0,5 casos de compromiso del SNC respectivamente por cada 100 pacientes diagnosticados con LLA.

Tabla 17. Incidencia del compromiso de SN en pacientes con LLA			
	Casos	Población	Tasa x 100
Tasa de incidencia total	8	132	6,1
Tasa de incidencia por citometría	2	132	1,5
Tasa de incidencia por citología	1	132	0,8

La tasa de incidencia aumenta al 49% si se tiene en cuenta que 32 pacientes tuvieron CMF y/o CC positiva al diagnóstico y 33 tuvieron positividad de estas pruebas en el seguimiento.

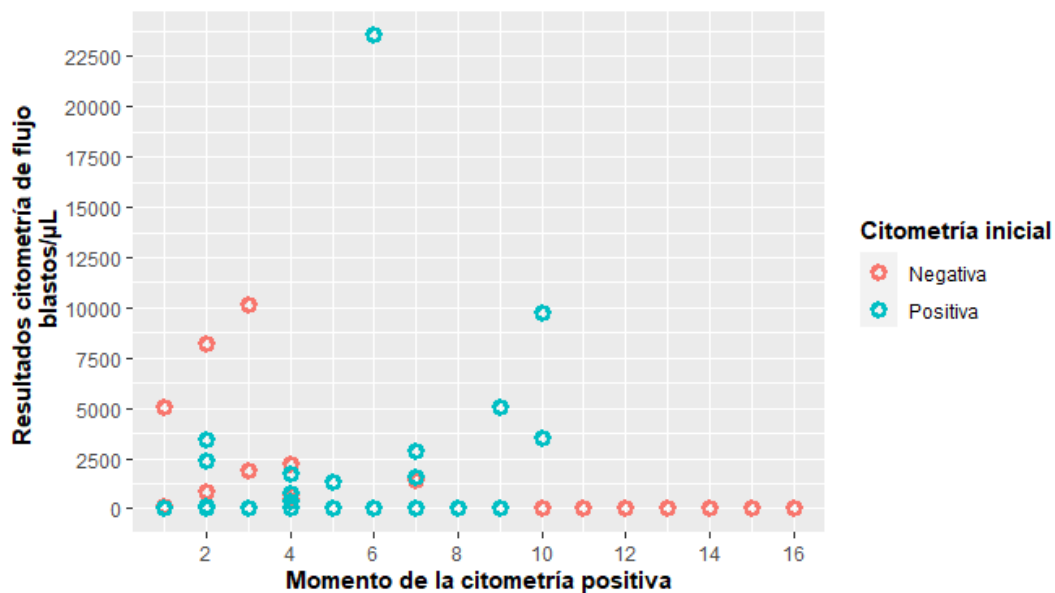
7.2.2.3 Compromiso del sistema nervioso por CMF y CC de LCR en el seguimiento

De los 100 pacientes con CMF en LCR al diagnóstico negativa, 33 tuvieron CMF y/o CC positiva en algún momento del seguimiento. En este grupo de pacientes el valor mínimo detectado por CMF fue de 0,03 blastos/ μ L y máximo de 23554.

En el gráfico 4 se observa que los pacientes que tuvieron una citometría inicial negativa tuvieron una mediana de 3 citometrías positivas posteriormente (RIC 3). La mediana de blastos/ μ L fue de 0,57 (RIC 10100). Tuvieron una mediana de 1 citología positiva posteriormente (RIC 1,5).

Los pacientes con CMF inicial positiva tuvieron una mediana de 2 citometrías positivas posteriormente (RIC 3). La mediana de blastos/ μ L fue 0,42 (RIC 6325). Tuvieron una mediana de 1 citología positiva posteriormente (RIC 2).

Gráfico 4. Comportamiento de valores de CMF en el seguimiento

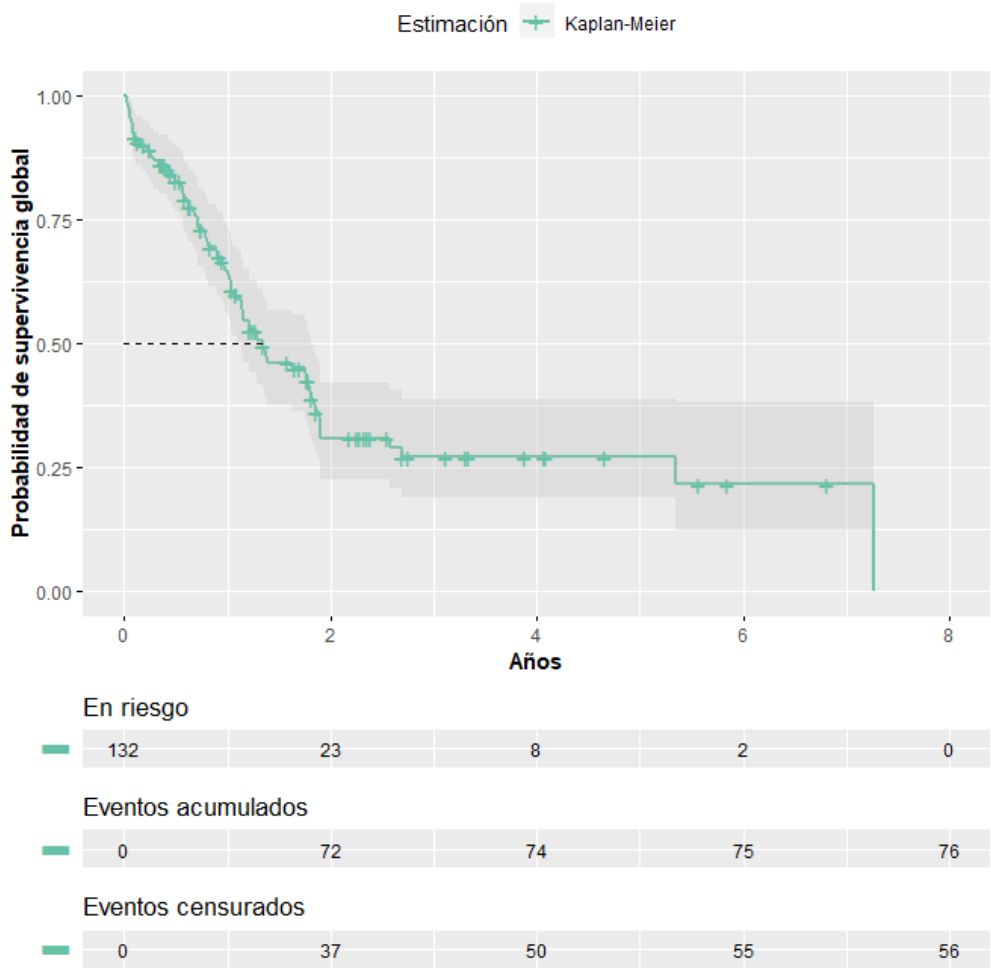


6.3.3 Desenlaces de supervivencia

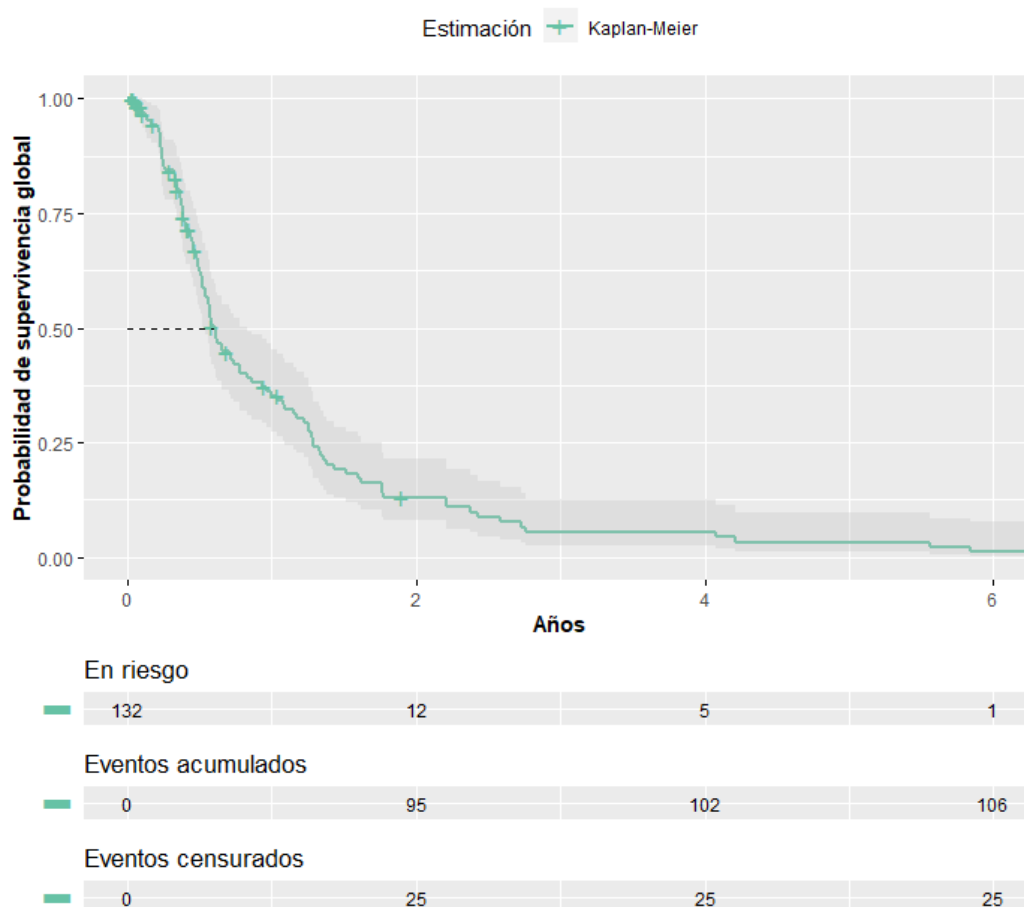
Supervivencia global y libre de enfermedad en toda la cohorte

Por el método de Kaplan Meier y censurando las pérdidas al seguimiento, la mediana de supervivencia global de la cohorte, definida como tiempo desde el diagnóstico hasta la muerte. Se presentaron 76 eventos de muerte con una mediana de supervivencia de 1.34 años (IC 95% 1,14-1,92 años). La probabilidad de supervivencia al año fue de 64,8% (IC 95% 56,6-74,1%). La probabilidad de supervivencia a los 3 años fue de 27,1% (IC 95% 18,9-38,9%). (ver gráfico 5).

Gráfico 5. Supervivencia global en toda la cohorte



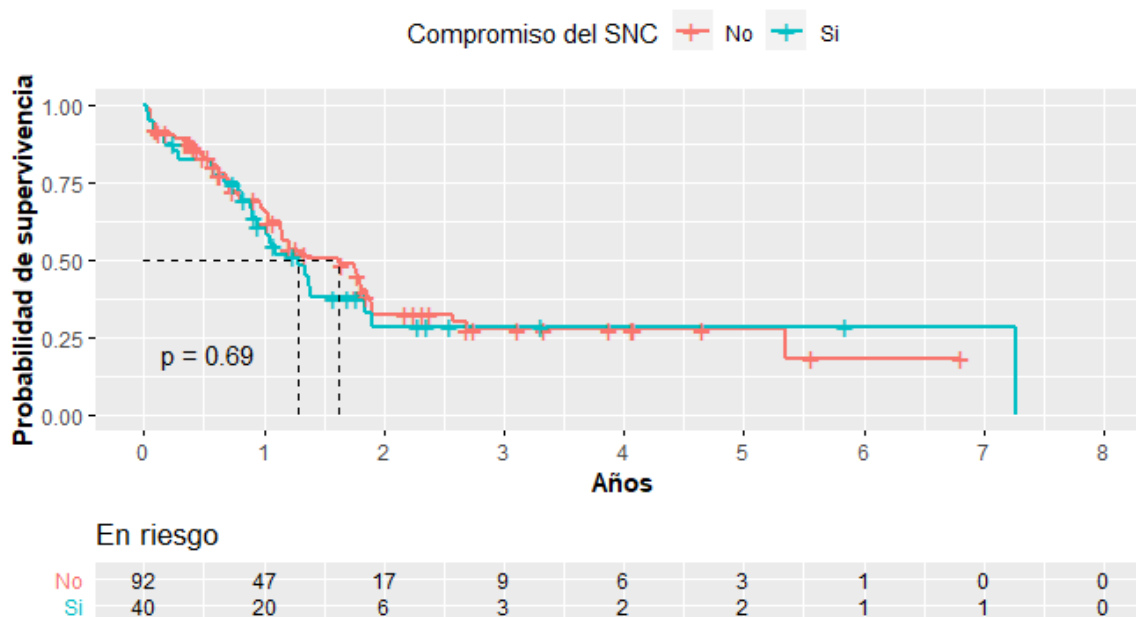
Se presentaron 107 eventos de recaída con una mediana de supervivencia de 0,59 años (IC 95% 0,53-0,83 años). La probabilidad de no recaída al año fue de 35,2% (IC 95% 27,3-45,5%). La probabilidad de no recaída a los 3 años fue de 5,4% (IC 95% 2,36-12,6%) y a los 5 años de 3,27% (IC 95% 1,8-9,8%) (ver gráfico 6).

Gráfico 6. Supervivencia libre de recaída en toda la cohorte


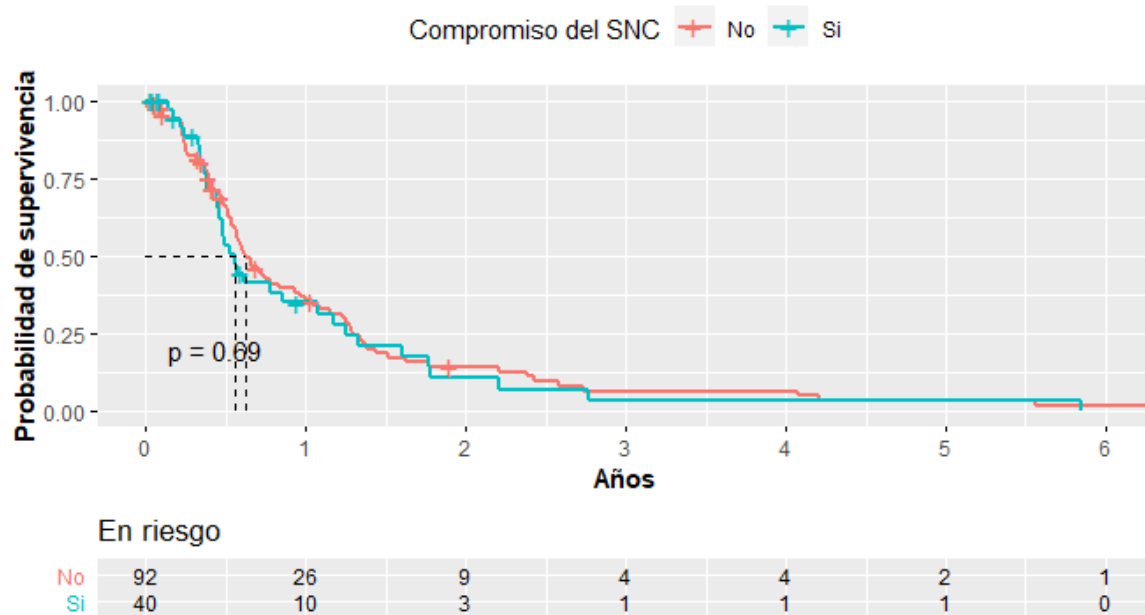
Supervivencia global y libre de recaída según compromiso del sistema nervioso clínico y/o laboratorio

En el gráfico 7 se observa que la mediana de tiempo de supervivencia para los pacientes sin compromiso del SNC fue de 1,63 años (IC 95% 1,13-1,9 años) y para los pacientes con compromiso del SNC fue de 1,28 años (0,94-1,9). Las diferencias no fueron significativas. En el primer año se presentaron 42 eventos de mortalidad. La probabilidad de supervivencia fue de 66,6% (IC 95% 56,95-77,92%) para los pacientes sin compromiso de SNC y de 60,8% (IC 95% 60,8-79,9%) para los que no tuvieron compromiso.

En el tercer año se presentaron 74 eventos de mortalidad. La probabilidad de supervivencia fue de 27% (IC 95% 17,95-42,1%) para los pacientes sin compromiso del SNC y de 28,35% (IC 95% 15,6-51,4%) para los que no tuvieron compromiso.

Gráfico 7. Supervivencia global según compromiso del SNC

En el gráfico 8 se observa que la mediana de tiempo de recaída para los pacientes sin compromiso del SNC fue de 0,62 años (IC 95% 0,54-0,96 años) y para los pacientes con compromiso fue de 0,56 años (0,45-1,17). Las diferencias no fueron significativas. En el primer año se presentaron 73 eventos de recaída. La probabilidad de recaída en los pacientes sin compromiso del SNC fue de 35,4% (IC 95% 26,2-48,0%). En el tercer año se presentaron 74 eventos de recaída, con una probabilidad de 27,5% (IC 95% 15,6-51,4%).

Gráfico 8. Supervivencia libre de recaída según compromiso del SNC


Supervivencia global y libre de recaída discriminado por valores de blastos de la CMF al diagnóstico

En el gráfico 9 A se observa que la mediana de supervivencia global en el cuartil C1 fue de 1,35 años (IC 95% 1,13-1,86), en el C2 fue de 1,84 años (1,83-NA), en el C3 fue de 0,74 años (0,56-NA) y C4 de 1,02 años (0,78-NA).

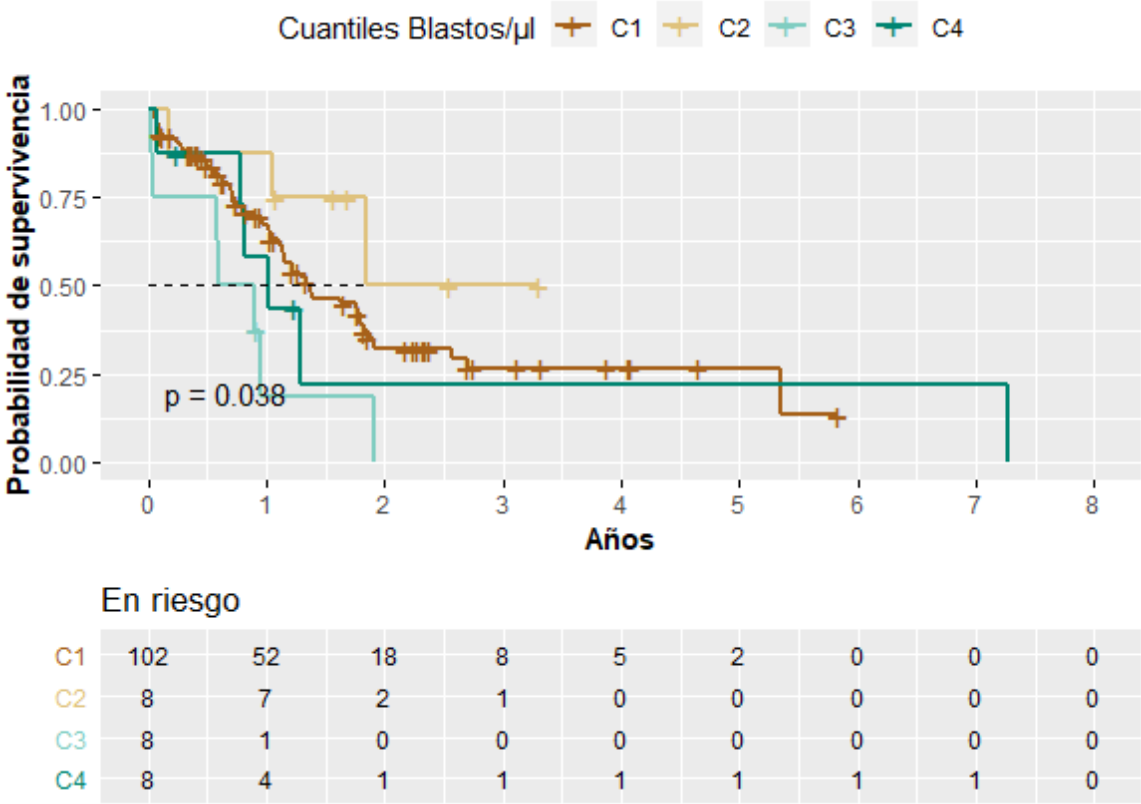
La probabilidad de supervivencia en el primer año para C1 fue de 67% (IC 95% 57,9-77,6%). En el tercer año la probabilidad de supervivencia fue de 25,6% (IC 95% 17,4-40,8%).

La probabilidad de supervivencia en el primer año para C2 fue de 87% (IC 95% 67,3-100%). En el tercer año la probabilidad de supervivencia fue de 50,0% (IC 95% 20,4-100%).

La probabilidad de supervivencia en el primer año para C3 fue de 18,8% (IC 95% 3,6-97,6%). Todos los pacientes de este grupo habían fallecido al tercer año

La probabilidad de supervivencia en el primer año para C4 fue de 58,3% (IC 95% 31,3-100%). En el tercer año la probabilidad de supervivencia fue de 21,8% (IC 95% 4,3-100%).

Gráfico 9 A. Supervivencia global por blastos/ μ L en la primera CMF al diagnóstico



En el gráfico 10 se observa que los pacientes con blastos/ μ L menor a 0,835 tuvieron una mediana de supervivencia de 1,38 años (IC 95% 1,15-1,86) con una probabilidad de supervivencia de 68,7% (IC 95% 60,1/78,6%) al primer año y de 28,3% (IC 95% 18,07-42,11%) al tercer año.

Los pacientes con blastos / μ L mayores a 0,835 tuvieron una mediana de supervivencia de 0,89 años (IC 95% 0,58-NA). La probabilidad de supervivencia al primer año fue de 39,5% (IC 95% 20,8-75,1%) y de 10,53% (1,7-62,4%) al tercer año.

Las diferencias fueron estadísticamente significativas (p=0,047)

En el gráfico 9B se compara la probabilidad de supervivencia de los pacientes con CMF en valor 0, con los que fueron positivos. La mediana de supervivencia para los negativos

fue de 496 días (IC 95% 415-664, C1 no alcanzó mediana de supervivencia, C2 673 días (673-NA), C3 271 días (208-NA) y C4 298 días (221 – NA).

La probabilidad de supervivencia en el primer año para CMF negativa fue de 65% (IC 95% 53,1-55,4%), para C2 y C3 87,5% (IC 95% 11,7-67,3%) y para C4 18,8% (IC 15,8 – 36%).

Gráfico 9 B. Supervivencia global por blastos/ μ L en la primera CMF al diagnóstico vs CMF negativa.

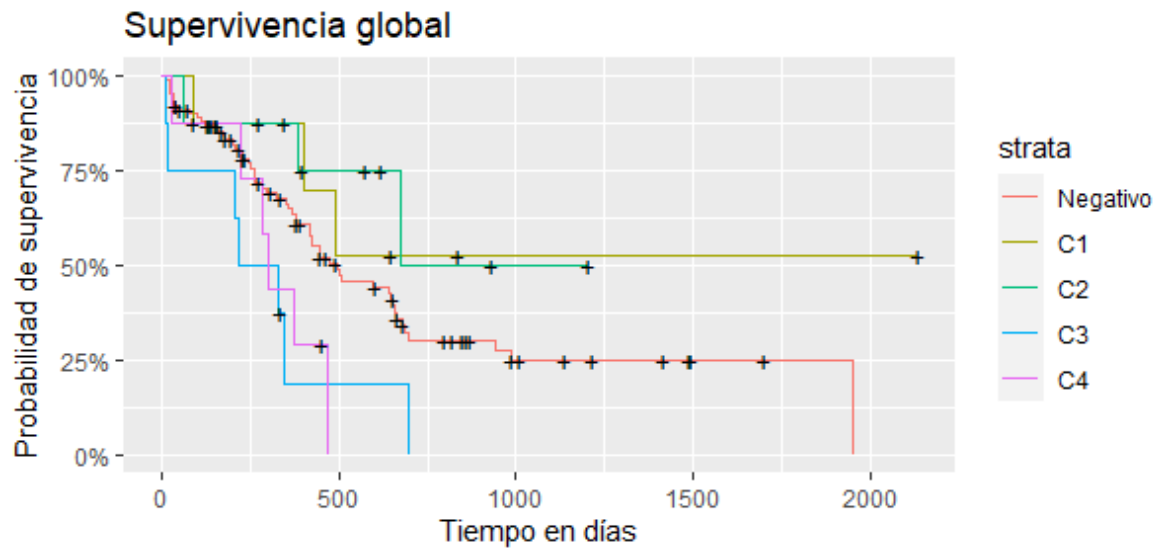
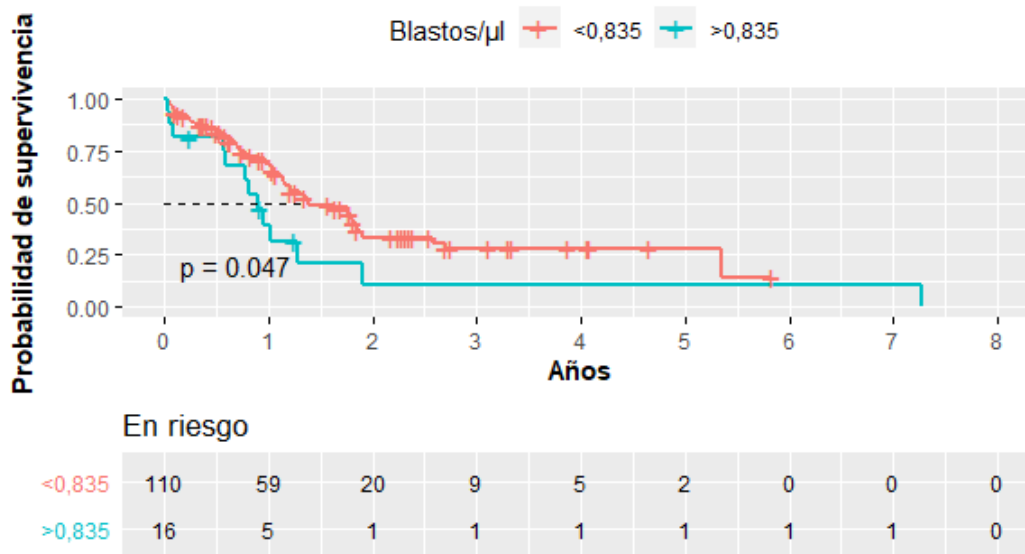


Gráfico 10. Supervivencia global discriminado por blastos/ μ L > o <de 0,835

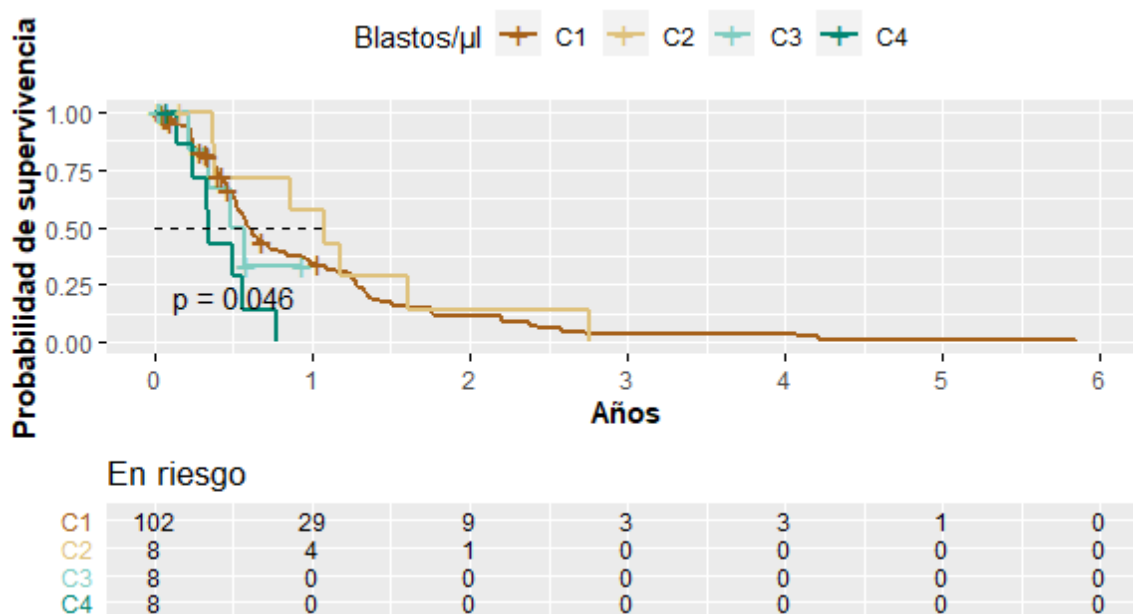


Recaída

En el gráfico 11 se observa que la mediana de tiempo libre de recaída fue de 0,59años (IC 95% 0,52-0,83) para el grupo en el cuartil C1, de 1,079 años (IC 95% 1,079-NA) para el C2, de 0,53 años para C3 (IC 95% 0,34-NA) y de 0,34 años (IC 95% 0,24-NA).

Los grupos C3 y C4 tuvieron una probabilidad de recaída de 100% antes del primer año. El grupo C1 tuvo 59 recaídas en el primer año con una probabilidad libre de recaída de 34,2% (IC 25,6-45,79%) y C2 tuvo 3 eventos con una probabilidad libre de recaída del 57,1% (30,1-100%). Para el tercer año el grupo C1 tuvo 84 eventos con una probabilidad libre de recaída del 3,6% (IC 1,2-11,1%). El grupo C2 tuvo recaída en el 100% de los casos antes del tercer año.

Gráfico 11. Supervivencia libre de recaída por valor de blastos/ μ L en la primera CMF al diagnóstico

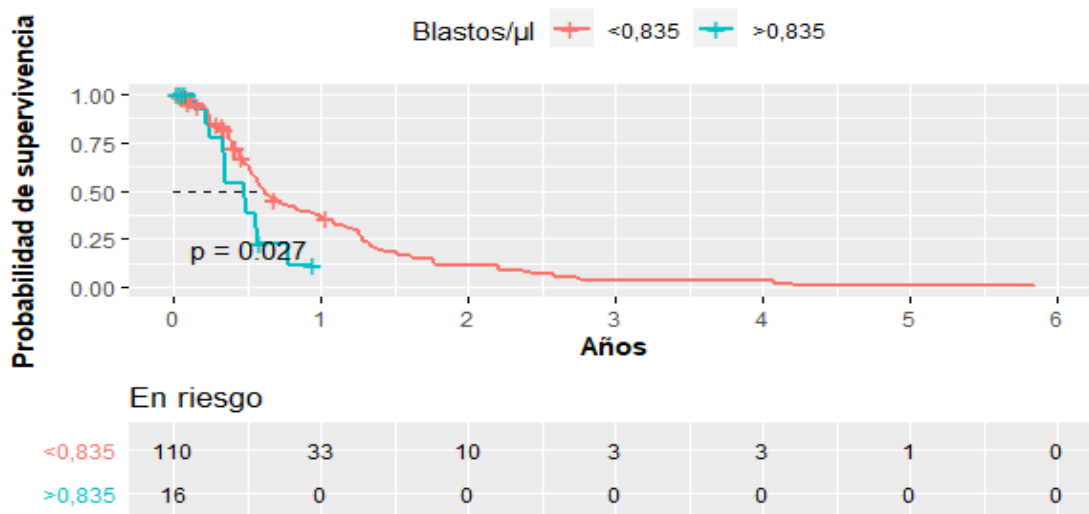


En el gráfico 12 se observa que los pacientes con blastos/ μ L menor a 0,835 tuvieron una media de tiempo sin recaída de 0,61 años (IC 95% 0,53-0,93) con una probabilidad sin recaída de 35,96% (IC 95% 27,4-47,05%) al primer año y de 3,33% (IC 95% 1,11-10,2%) al tercer año.

Los pacientes con blastos / μ l mayores a 0,835 tuvieron una mediana de tiempo de sin recaída de 0,48 años (IC 95% 0,33-NA). El 100% de los pacientes tuvieron recaída antes del primer año en este grupo.

Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,027$)

Gráfico 12. Supervivencia libre de recaída discriminado por blastos/ μ L > o <de 0,835



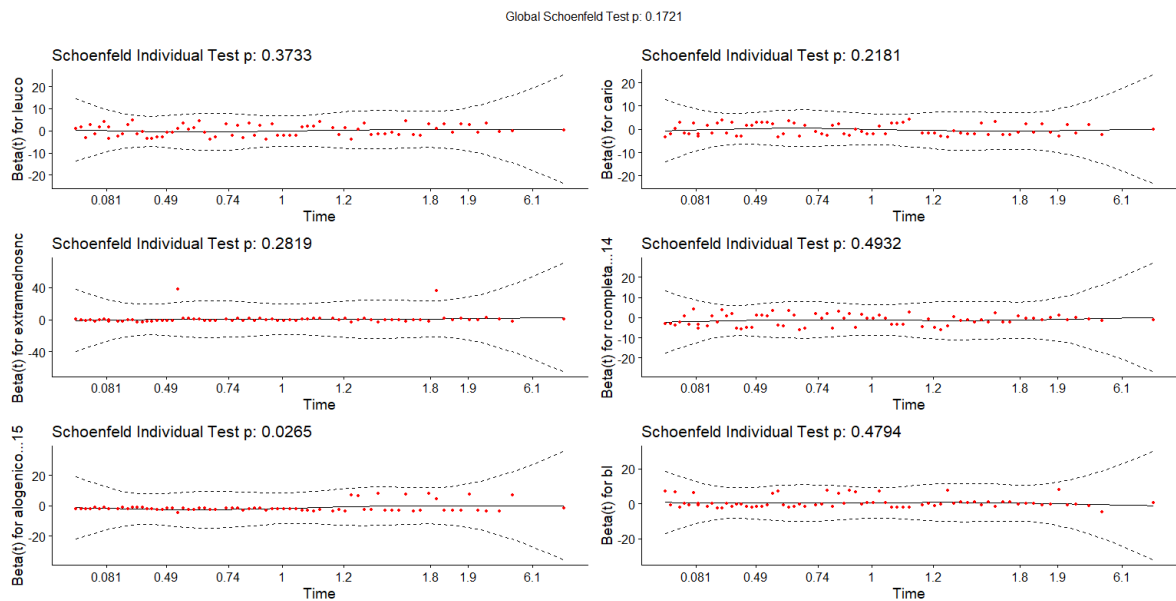
6.3.4 7.2.4 Modelo de riesgos proporcionales COX

Modelo de supervivencia

En el modelo se observa que los pacientes que tuvieron remisión completa tuvieron un aumento en la supervivencia en 21,2% (IC 95% 13,04-32,4%). Los pacientes con trasplante alogénico tuvieron un aumento en la supervivencia en un 20,6% (IC 95% 10,7-35,4%).

Tabla 18. Modelo regresión COX supervivencia				
Característica	HR ¹	IC ² 95%		P
		Lim Inf	Lim sup	
Leucocitos mayores a 30.000	1,08	0,64	1,83	0,8
Cariotipo t9;22	0,83	0,5	1,36	0,5
Compromiso diferente al SNC	1,55	0,36	0,61	0,6
Remisión completa	0,27	0,15	0,48	<0,001
Trasplante alogénico	0,26	0,12	0,55	<0,001
Blastos >0,835/μl	1,67	0,86	3,24	0,13
¹ HR: Hazard ratio, ² IC: Intervalo de confianza				

Gráfico 13. El modelo cumple con el supuesto de riesgos proporcionales



Modelo de recaída

En el modelo se observa que el trasplante alogénico disminuye el riesgo de recaída en 28,1% (IC 95% 18,03-40,48%). Los valores de blastos mayores que 0,835/μl aumenta el riesgo de recaída 2,05 veces (IC 95% 1,03-4,06).

Tabla 19. Modelo de regresión COX para recaída				
Característica	HR ¹	IC ² 95%		P
		Lim Inf	Lim sup	
Leucocitos mayores a 30.000	1,18	0,77	1,81	0,44
Cariotipo t9;22	1,10	0,73	1,65	0,65
Compromiso diferente al SNC	1,01	0,73	1,65	0,99
Remisión completa	1,27	0,71	2,29	0,42
Trasplante alogénico	0,39	0,22	0,68	<0,001
Blastos >0,835/μl	2,05	1,03	4,06	0,041
¹ HR: Hazard ratio, ² IC: Intervalo de confianza				

7. Discusión

El diagnóstico del compromiso del sistema nervioso en LLA está basado en la presencia de células leucémicas en LCR dado que los síntomas son leves o de aparición tardía, dentro de las herramientas diagnósticas de laboratorio disponibles la baja sensibilidad de la CC puede reducir la tasa de detección de células malignas causando efectos deletéreos para el paciente, por lo que en los últimos años ha surgido la CMF como una técnica con ventajas en sensibilidad, especificidad, capaz de detectar mínimas concentraciones de blastos leucémicos en el LCR y adicionalmente algunos trabajos sugieren que sus resultados pueden tener implicación pronóstica decisiva en el tratamiento, lo que motivo al desarrollo de este estudio (5,8,32). Esta es la primera cohorte a nivel nacional en la que se exploró la supervivencia global y libre de recaída discriminada por valor absoluto de blastos detectados por CMF en LCR al diagnóstico en adultos con LLA de precursores linfoides B.

Se incluyeron 132 pacientes, sin diferencias significativas en género, siendo el principal motivo de exclusión la edad menor a 18 años que se consideró desde el inicio del estudio ante las conocidas diferencias en evolución natural de la enfermedad en población pediátrica (4).

Diversos factores pronósticos desfavorables han sido descritos en grandes estudios desde hace varios años en esta entidad (Lee 2006, Lazarus 2006, Rowe 2005, Kantarijan 2004 y Hoelzer 1988), entre ellos la edad, la presencia de leucocitos > a 30.000, anormalidades citogenéticas, pruebas moleculares positivas, compromiso extramedular y del SNC, variables que fueron exploradas en este estudio.

Comparado con el pico de presentación de los 50 a 60 años clásicamente descrito en adultos con LLA (1,2,3), en este estudio se encontró una edad de presentación más temprana con una mediana de 34 años, los pacientes tuvieron un buen estado funcional al diagnóstico, encontrando que el 94.7% se clasificó entre un ECOG 0 y 2. La mayoría de los pacientes tuvieron alto riesgo al momento de la presentación si se tiene en cuenta la mediana del recuento leucocitario en el primer hemograma disponible antes de recibir cualquier tipo de tratamiento de 55238.24 leucocitos c/ μ l (RIC 99451.34).

Otro de los factores que proporcionan información pronóstica y que son decisivos en la elección del tratamiento son las anormalidades citogenéticas y moleculares, siendo la presencia del cromosoma de Philadelphia la que mayor impacto pronóstico tiene. El cariotipo en LLA se ha reportado como anormal hasta en el 75% de los casos, con una prevalencia de t (9;22) del 15 a 50% que se incrementa con la edad (2), en esta cohorte se encontró que el 30.4% de los pacientes tenían cariotipos anormales y las pruebas moleculares fueron positivas en el 13.6%, un porcentaje menor a lo descrito en la literatura, sin embargo es concordante con que la t(9;22) fue la anormalidad citogenética más frecuentemente encontrada y este grupo presentó una mayor mediana de edad de 42 años. Adicionalmente la tasa de detección de pacientes con cromosoma de Philadelphia aumentó en sensibilidad al realizar cariotipo y pruebas moleculares, de aquí se resalta la importancia del análisis conjunto de los dos métodos.

La mayoría de las manifestaciones clínicas de LLA reflejan la acumulación de células malignas en la médula ósea, sangre y sitios extramedulares, causando linfadenopatía, esplenomegalia o hepatomegalia en el 20% de los pacientes. En este trabajo se encontró que el compromiso extramedular al diagnóstico diferente al SNC incluyó los siguientes órganos: riñón, glándula suprarrenal, piel, hígado y páncreas, en el 3.8% de los pacientes, porcentaje menor a lo reportado en estudios previos, esta menor incidencia puede estar relacionada a que el criterio para definir compromiso extramedular requería la confirmación con estudio histopatológico.

Además de las características clínicas en la presentación de la enfermedad, se reconoce que el tipo de tratamiento de primera línea y la respuesta a la terapia de inducción predice resultados importantes, por lo que se describen a continuación las características del tratamiento.

En esta cohorte, los dos esquemas terapéuticos más usados fueron GRAALL 2003, seguido de HyperCVAD; los pacientes que recibieron esquema GRAALL 2003 fueron más jóvenes con una mediana de edad de 27 años comparado con los pacientes que recibieron tratamiento con esquema HyperCVAD y CALGB que fueron mayores con una mediana de edad de 45 y 55 años respectivamente. Entre otras variables importantes de riesgo, el recuento de leucocitos fue diferente entre cada grupo de tratamiento, los pacientes del grupo que recibieron Rituximab, tanto como los que recibieron ITK y los de GRAAPH 2005 tuvieron mediana de leucocitos más alto. El esquema de tratamiento con mayor número de quimioterapia intratecal fue GRAAPH 2005 seguido de R-GRAALL 2003/05.

Históricamente la positividad del cromosoma de Philadelphia, ha sido considerada como un factor de mal pronóstico con una supervivencia a 5 años del 5 al 20%, sin embargo, con el advenimiento de los ITK esta supervivencia asciende al 35 – 55%. Por tanto, todos los pacientes con cromosoma Philadelphia positivo, de acuerdo con las guías de evidencia clínica debieron recibir tratamiento con ITK, sin embargo, se encontró que, por diferentes motivos, entre ellos retraso en el resultado de los estudios de citogenética y pruebas moleculares no lo recibieron, lo que se tuvo en cuenta para el análisis de supervivencia en este grupo.

Según la literatura la remisión completa con la inducción se describe hasta en el 85% con algunos esquemas de tratamiento (74), sin embargo, solo 30 – 40% de los adultos con LLA logran remisión a largo plazo (16). En este estudio se encontró que la remisión completa con el esquema de inducción fue de 68,18%, un porcentaje menor a lo descrito, y discriminado por esquemas de tratamiento el único que logró 100% de respuesta fue GRAAPH 2005 y del esquema más usado que fue GRAAL 2003, la respuesta fue mayor al 50%, sin embargo es llamativo que en el segundo tratamiento más recibido que fue HyperCVAD la remisión completa fue inferior al 50%, contrario a los datos encontrados en otras series como en el ensayo ECOG que reportan una tasa de remisión completa hasta del 92% (29).

Respecto al tratamiento del SNC durante la inducción y terapias posteriores, este se ha convertido en una parte integral de todos los protocolos, dado que la recurrencia del compromiso neurológico en LLA es más fácil prevenirla que tratarla, (5) en este estudio

81% de los pacientes recibió combinación de terapia intratecal en la inducción en todos los esquemas.

Otro punto importante de implicación pronóstica en el tratamiento incluye el trasplante de médula ósea, indicado según la clasificación clínica de riesgo y de la respuesta a la inducción, mostrando que los pacientes trasplantados aumentan las tasas de supervivencia a largo plazo (29), en esta cohorte el 14,39% tuvo trasplante alogénico y los pacientes que lo recibieron tuvieron una mejor supervivencia global como se mostrará más adelante.

En términos de supervivencia global y libre de recaída, se conoce que cuando la LLA ocurre en adultos los resultados son inferiores comparado con la población pediátrica que muestra supervivencia a largo plazo del 90% (29). En adultos mayores a 60 años, la supervivencia global a largo plazo reportada en la literatura es del 10 al 15%, en probable relación a que la edad se asocia a factores biológicos intrínsecos desfavorables, entre ellos mayor frecuencia de cromosoma de Philadelphia positivo, hipodiploidia, cariotipo complejo, mayor número de comorbilidades y menor capacidad para tolerar los regímenes de quimioterapia (43). En el gran ensayo prospectivo MRC UKALL XII /ECOG (29) se realizó una clasificación de riesgo basada en la edad y recuento de leucocitos: bajo riesgo < 35 años y leucocitos < 30.000, riesgo intermedio > 35 años o leucocitos > 30.000 y alto riesgo > 35 años y leucocitos > 30.000, a 5 años la supervivencia global según esta categoría de riesgo fue de 55, 34 y 5% respectivamente; concordante a lo encontrado en este estudio, en nuestra cohorte la supervivencia global a 3 años fue del 27.1 % (IC 95% 18,9-38,9%) los pacientes estarían clasificados en un riesgo intermedio por la mediana de edad 34 años y mediana de leucocitos > a 30.000.

Respecto a la recaída, esta se presentó en el 57,58% de toda la cohorte; los tipos de recaída más frecuentes fueron medular aislada y medular/SNC, con una probabilidad de no recaída a los 3 años del 5,4% (IC 95% 2,36-12,6%) y a los 5 años de 3,27% (IC 95% 1,8-9,8%).

La implicación pronóstica del compromiso del sistema nervioso central en LLA ha sido controversial, algunos trabajos como Mahmoudh 1993 y Pui Ch 2008 (20), realizados en población pediátrica, proponen que la presencia de cualquier célula blástica en LCR se asocia con un mayor riesgo de recaída del SNC sin embargo otros autores como Rowe

2005, Kantarijan 2004 no han encontrado esta asociación, de aquí la importancia de explorar en esta cohorte el compromiso del sistema nervioso que se describe según las manifestaciones clínicas y de estudio de LCR.

El compromiso únicamente clínico del SNC que se definió por signos y síntomas presentados al momento del diagnóstico, tuvo una incidencia de 6,1%, hallazgos que reproducen lo reportado en la literatura universal que describen porcentajes entre 5 -10% (1,5). Las manifestaciones que se describen con mayor presentación en las series son neuropatía craneal y meningismo, en este estudio la sintomatología neurológica fue clasificada en grandes síndromes, siendo el compromiso piramidal el más frecuentemente presentado; algunas series han intentado demostrar la asociación entre carga tumoral en el torrente sanguíneo con la relacionada en SNC y han encontrado que a mayor número de leucocitos en sangre puede presentarse mayor probabilidad de síntomas neurológicos (25,38), en este estudio no se encontró dicha asociación, la mediana del recuento de leucocitos fue incluso menor en comparación con los pacientes que no presentaron clínica neurológica, sin embargo el tamaño de la muestra es bajo, representa solo 8 pacientes de toda la cohorte, lo que no permite realizar asociaciones con significancia estadística.

En contraste con el compromiso clínico, la incidencia del compromiso de SNC definido por positividad en CMF y/o CC de LCR tanto en el diagnóstico como en el seguimiento fue del 49,2%, superior a lo reportado en otras series nacionales del 6% a 13,4% que incluyen población pediátrica (58). Cabe aclarar que el compromiso de sistema nervioso por estudios de LCR, fue definido en esta cohorte como la presencia de cualquier valor absoluto de blastos en citometría de flujo y/o positividad en citología, a lo que se podría atribuir el aumento de la incidencia, o por otro lado a que realmente si hay una incidencia más alta y no había sido detectada.

Desde la primera publicación que utilizó la CMF como un método útil para la detección de células malignas en LCR en pacientes con neoplasias hematológicas, un número creciente de trabajos han demostrado las ventajas de este método sobre la citología convencional (26), entre ellas la CMF permite la cuantificación de los blastos presentes en la muestra, a diferencia de la CC que únicamente reporta los resultados de forma cualitativa (positivo, negativo, sospechoso y atípico), adicionalmente la CMF no solo logra

detectar los pacientes con infiltración en SNC al diagnóstico, sino también es capaz de detectarlos durante la evolución clínica de la enfermedad, siendo esto relevante en pacientes que reciben quimioterapia intratecal de forma profiláctica, siendo bajo este escenario más difícil la detección de células tumorales.

En esta cohorte retrospectiva se demostró que la tasa de detección de compromiso de SNC fue mayor por citometría de flujo, en comparación con el análisis de citología convencional, con una mediana de 0,835 valor absoluto de blastos/ μ l, lográndose una sensibilidad de detección de 0.03 blastos/ μ l, resultado que apoya aún más la capacidad superior de esta técnica en el diagnóstico de enfermedad leptomeníngea oculta.

Algunos autores han demostrado resultados discordantes como CC+/CMF- (9,27,28,32, 75), en el presente estudio no se encontró esta discordancia, solo 5 casos positivos por CC fueron negativos por CMF tanto al diagnóstico como al seguimiento y el análisis de concordancia entre el resultado de la citología y la citometría de flujo mostró un valor de Kappa de 0,49 el cual es moderado, estadísticamente significativo.

De las muestras positivas de LCR por cualquiera de los dos métodos, el 37,5% fueron positivas tanto en citometría como en citología al diagnóstico y el 45,4% en las muestras de seguimiento, encontrándose que a mayor número de blastos mayor probabilidad que los dos métodos sean positivos; algunos estudios relacionan la positividad en los dos métodos diagnósticos con la presencia de sintomatología neurológica por la probable mayor carga tumoral en LCR (56,63), en este estudio no se encontró dicha afirmación, dado que ninguno de los pacientes con síntomas neurológicos al diagnóstico tuvo las dos pruebas positivas, sin embargo los pacientes con compromiso clínico del SNC si tuvieron una mayor mediana de blastos por microlitro comparado con los que no tenían este compromiso clínico al diagnóstico (3,95 vs 0,84 blastos/ μ l).

Respecto a los valores para definir compromiso del sistema nervioso por laboratorio, según la revisión de la literatura, se ha descrito que la citometría de flujo puede detectar valores tan bajos como 0,001 blastos/ μ l (5) ; sin embargo los puntos de corte no han sido validados para todos los grupos y estos datos son en su mayoría extrapolados de población pediátrica, en esta cohorte se encontró en las 172 muestras positivas de CMF tomadas tanto al diagnóstico como al seguimiento un valor mínimo de blastos detectados de 0,03 μ l, sin embargo se requiere otro tipo de estudio que permita estandarizar dichos valores.

Dos factores para tener en cuenta en la interpretación de los resultados de LCR son la punción lumbar traumática, que podría eventualmente introducir de forma involuntaria blastos al LCR durante el procedimiento, y el uso de solución estabilizante que prolonga la viabilidad de las células en la muestra. En esta cohorte, de todas las pruebas, el 16,67% de las punciones fueron traumáticas y se usó Transfix como solución estabilizante en el 90.9% de las muestras. Sigue siendo incierto y se requieren más estudios para evaluar si los pacientes con punción lumbar traumática y blastos confirmados por CMF se benefician de una terapia intratecal intensificada durante la fase de inducción o si deben recibir modificación en la terapia sistémica o tratamiento intensificado dirigido en SNC.

Entre los factores de riesgo independientes en pacientes con citometría de flujo positiva en LCR, se encontró un recuento mayor de leucocitos al momento del diagnóstico, que también se ha identificado en otros estudios (38,60) y es acorde a lo descrito ya que se considera como una variable asociada a mayor riesgo de recaída en SNC. Se han descrito también diferentes alteraciones genéticas asociadas a mayor riesgo de infiltración en SNC como: t(9;22) (q34;q11) con BCR-ABL; t(4;11) con MLL-AF4; inv 16 y t(1;19) con E2A-PBX1 (2, 3, 30) las cuales también impactan junto con otras variables en la clasificación del riesgo del paciente. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró asociación entre la presencia de alteraciones genéticas y la infiltración en SNC al diagnóstico. Estos hallazgos pueden estar asociados al bajo número de casos positivos para las alteraciones genéticas encontradas.

Respecto al compromiso del SNC y la respuesta al tratamiento, se encontró que de los pacientes con CMF positiva al diagnóstico 71,9% tuvieron respuesta completa, sin embargo 68,75% tuvieron recaída, este hallazgo apoya el concepto que el SNC es un santuario para los blastos leucémicos.

De los pacientes con citometría positiva solo 4 recibieron trasplante de médula ósea, 2 murieron y 2 presentaron recaída, los datos no son representativos para realizar asociaciones, pero en otros estudios se ha encontrado que en los pacientes con CMF positiva al diagnóstico, el trasplante alogénico temprano mejora la supervivencia global y libre de recaída.

Como se mencionó anteriormente, otra de las ventajas que se propone de los valores de blastos detectados por CMF en LCR es su implicación pronóstica, sin embargo, con resultados controversiales. En el ensayo MRC/ECOG que incluyó 1508 pacientes con LLA 5% de los pacientes tenían compromiso del SNC en el momento de presentación de la enfermedad, el compromiso del SNC fue significativo para supervivencia global y no para supervivencia libre de eventos, la supervivencia a los 5 años fue del 29% en aquellos con afectación del SNC en el momento del diagnóstico en comparación con el 38% para aquellos sin compromiso del SNC (29). En este estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con compromiso clínico y de laboratorio comparado con los que no lo tuvieron (p 0.69), sin embargo, basado en el objetivo principal de este trabajo, se planteó evaluar la supervivencia global y libre de recaída discriminada por valores absolutos de blastos de la CMF en LCR realizada al diagnóstico, encontrando que los pacientes con blastos $>$ a 0.085 tenían una probabilidad de supervivencia global menor (p 0.047) y un mayor riesgo de recaída (p 0.027). Lo que indica que la positividad aislada de la CMF tiene significado clínico y permite poner a consideración que el valor absoluto de blastos detectados en la primera muestra de LCR al diagnóstico debe tenerse en cuenta para la decisión de los lineamientos terapéuticos dada su implicación pronóstica.

Se elaboró un modelo multivariado que mejor soportara la parametrización encontrada, incluyendo variables que se describieron previamente estar asociadas a supervivencia en LLA de precursores linfoides B: leucocitos $>$ 30.000, cariotipo con t 9;22, compromiso extramedular diferente al SNC, remisión completa con la inducción y trasplante alogénico.

Según lo reportado en otras series, el 43% de los 30 pacientes sometidos a alotrasplante en la primera remisión estaban vivos en comparación con 26% de 27 pacientes que recibieron tratamiento convencional de consolidación y mantenimiento y la respuesta con la inducción mejoró la mediana de supervivencia global a 36 meses (29). En este modelo se encontraron hallazgos similares, la supervivencia global aumentó en los pacientes que tuvieron remisión completa con el ciclo de inducción en 21,2% (IC 95% 13,04-32,4%) y trasplante alogénico en un 20,6% (IC 95% 10,7-35,4%) y respecto a la supervivencia libre de recaída, el trasplante alogénico disminuyó este riesgo en un 28,1% (IC 95% 18,03-40,48%). Se concluyó que estas variables se ajustan al supuesto de proporcionalidad.

Con lo anterior, se permite concluir que los valores absolutos de blastos detectados por citometría de flujo en LCR al diagnóstico afectan la duración de la supervivencia global y libre de recaída de forma independiente.

Dentro de las limitaciones del estudio, la selectividad en los criterios de inclusión afectó el tamaño de cohorte, consideración que debe tenerse en cuenta para la validez externa de los datos. Debido al diseño retrospectivo se generaron sesgos de seguimiento por la falta de datos lo cual limitó el número de pacientes para las comparaciones de asociaciones planteadas y pudo afectar la significancia estadística de las mismas al discriminar los resultados. Con el diseño de este estudio y el número de pacientes de la cohorte, solo podemos acercarnos a la descripción de las asociaciones encontradas, que pueden ser tenidas en cuenta para futuros trabajos con diseños que permitan esclarecer dichas asociaciones.

8. Conclusiones y recomendaciones

La CMF mejora la eficacia diagnóstica y ayuda a identificar un grupo de pacientes con alto riesgo de recaídas leucémicas, este estudio encontró que a mayor número blastos detectados en la primera CMF de LCR al diagnóstico hay un menor tiempo de supervivencia global y mayor probabilidad de recaída, lo anterior ajustado al efecto de covariables sociodemográficas y clínicas pronósticas potencialmente relacionadas.

La importancia de explorar este tema mediante estudios prospectivos radica en que los pacientes con resultados positivos y valores altos de blastos en LCR podrían beneficiarse de una intensificación de terapia sistémica y/o dirigida al SN en lugar de profilaxis.

Los puntos de corte para definir compromiso del sistema nervioso por positividad de citometría de flujo en LCR no han sido extrapolados para todos los grupos poblacionales y los valores actualmente aceptados han sido tomados de población pediátrica, este estudio encontró que valores mínimos de blastos pueden ser detectados por CMF con un valor tanto al diagnóstico como en el seguimiento mínimo de 0,03 blastos u/L.

A. Anexo: Cronograma de actividades

[illegible]

Redacción artículo original						X									X
Envío a Revista Científica						X									X

Tabla 20B. Cronograma de actividades Investigadora No 2: Pilar Enríquez Ruano (Residente Neurología)

[illegible]

B. Anexo: Presupuesto

Tabla 21. Presupuesto					
CONCEPTOS PRESUPUESTALES	FUENTE DE LOS INVESTIGADORES				TOTAL
	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3	TOTAL	
Talento humano	1'000.000			1'000.000	1'000.000
Servicios técnicos					
Compra de equipos	3'480.000			3'480.000	3'480.000
Equipos de uso propio					
Materiales y suministros	20000			20000	20000
Comunicaciones y transporte	200000			200000	200000
Impresos y publicaciones	100000			100000	100000
Viáticos y gastos de viaje	200000			200000	200000
Gastos operacionales					
Arrendamiento de bienes muebles					
Gastos administrativos					
TOTAL	5'000.000			5'000.000	5'000.000*
*Los gastos de la investigación serán asumidos por las investigadoras principales.					

Bibliografía

1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 2013.
2. Richard-Carpentier G, Kantarjian H, Jabbour E. Recent Advances in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*. Current Science Inc.; 2019.
3. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Vol. 371, *The Lancet*. 2008. p. 1030–43.
4. Tomizawa D, Kiyokawa N. Acute lymphoblastic leukemia. In: *Hematological Disorders in Children: Pathogenesis and Treatment*. 2017.
5. Larson RA. Managing CNS disease in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 2018.
6. Thomas X, Le Q-H. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia. 2013; Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=yhem20>
7. Cortes J. Central nervous system involvement in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2001;
8. Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2010.
9. Scharf EL, Hanson CA, Howard MT, Keegan BM. Serial cerebrospinal fluid examinations to diagnose hematological malignancy causing neurological disease. *J Neurooncol*. 2016;
10. Gupta S, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Chen S, Wang C, et al. Flow-cytometric vs. -morphologic assessment of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group (COG). *Leukemia*. 2018 Jun 1;32(6):1370–9.
11. Pauls S, Fischer AC, Brambs HJ, Fetscher S, Höche W, Bommer M. Use of magnetic resonance imaging to detect neoplastic meningitis: Limited use in leukemia and lymphoma but convincing results in solid tumors. *Eur J Radiol*. 2012 May;81(5):974–8.
12. Chamberlain M, Junck L, Brandsma D, Soffietti R, Rudà R, Raizer J, et al. Leptomeningeal metastases: A RANO proposal for response criteria. *Neuro-Oncology*. 2017.
13. Nam AS, Giorgadze T, Tam W, Chadburn A. Assessment of the Utility of Cytology and Flow Cytometry of Cerebrospinal Fluid Samples in Clinical Practice. *Acta Cytol*. 2018;

14. Galati D, Di Noto R, Del Vecchio L. Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies. *Leukemia Research*. 2013.
15. Felipe Combariza J, Casas CP, Rodriguez M. *Rev Colomb CanCeRol* 2007;11(2):92-100 93.
16. Jabbour E, Thomas D, Cortes J, Kantarjian HM, O'Brien S. Central nervous system prophylaxis in adults with acute lymphoblastic leukemia: Current and emerging therapies. *Cancer*. 2010.
17. Levinsen M, Marquart H V., Groth-Pedersen L, Abrahamsson J, Albertsen BK, Andersen MK, et al. Leukemic blasts are present at low levels in spinal fluid in one-third of childhood acute lymphoblastic leukemia cases. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Nov 1;63(11):1935–42.
18. Winick N, Devidas M, Chen S, Maloney K, Larsen E, Mattano L, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Impact of Initial CSF Findings on Outcome Among Patients With National Cancer Institute Standard-and High-Risk B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017;35:2527–34. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2016>.
19. Biojone E, De Paula Queiróz R, Valera ET, Odashima NS, Takayanagui OM, Viana MB, et al. Minimal residual disease in cerebrospinal fluid at diagnosis: A more intensive treatment protocol was able to eliminate the adverse prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;
20. Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *The Lancet Oncology*. 2008.
21. Lightfoot T, Smith A, Roman E. Leukemia. In: *International Encyclopedia of Public Health*. Elsevier Inc.; 2016. p. 410–8.
22. Conter D V, Biondi PA. Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. Available from: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-ALL.pdf>
23. Igwe IJ, Yang D, Merchant A, Merin N, Yaghmour G, Kelly K, et al. The presence of Philadelphia chromosome does not confer poor prognosis in adult pre-B acute lymphoblastic leukaemia in the tyrosine kinase inhibitor era – a surveillance, epidemiology, and end results database analysis. *Br J Haematol*. 2017 Nov 1;179(4):618–26.
24. Richard-Carpentier G, Kantarjian H, Jabbour E. Recent Advances in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;
25. Frishman-Levy L, Izraeli S. Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy. *British Journal of Haematology*. 2017.
26. Gong X, Lin D, Wang H, Wang Y, Liu B, Wei H, et al. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid in adult patients with acute lymphoblastic leukemia during follow-up. *Eur J Haematol*. 2018;
27. Roman A, Bernacer M, Garcia R, Aceituno E, Castanon S, Subira D, et al. Flow cytometry and the study of central nervous disease in patients with acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;
28. Jiménez-Castillo RA, Salazar-Riojas R, Fernández LT, Méndez-Ramírez N, Gómez-

- Almaguer D, Borrego-López MF, et al. Comparison of conventional cytomorphology, flow cytometry immunophenotyping, and automated cell counting of CSF for detection of CNS involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2017;
29. Lazarus HM, Richards SM, Chopra R, Litzow MR, Burnett AK, Wiernik PH, et al. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: Results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*. 2006;
 30. Martínez-Laperche C, Gómez-García AM, Lassaletta Á, Moscardó C, Vivanco JL, Molina J, et al. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am J Hematol*. 2013 May;88(5):359–64.
 31. Brown L, Sailors J, Tawfik B, Niu S, Sadeghi N, Fuda F, et al. Utility and proposed algorithm of CSF flow cytometry in hematologic malignancies. *Ann Hematol*. 2018;
 32. Saxena R, Pati HP, Dayama A, Seth T, Dass J, Mahapatra M, et al. Higher rate of central nervous system involvement by flow cytometry than morphology in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2017;
 33. Labardini Méndez JR, Ceballos EC, Genaro O, Navarro L, Alfaro CC, Balbuena Martínez M, et al. Leucemia Linfoblástica Aguda.
 34. Davis AS, Viera AJ, Mead MD. Leukemia: An Overview for Primary Care [Internet]. Vol. 89. 2014. Available from: www.aafp.org/afp.
 35. Leukaemia Source: Globocan 2018 [Internet]. 2018. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
 36. Colombia. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Cancerología. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia.
 37. Grigoropoulos NF, Petter R, Van'T Veer MB, Scott MA, Follows GA. Leukaemia update. Part 1: Diagnosis and management. Vol. 346, *BMJ* (Online). 2013.
 38. Kantarjian HM, Walters RS, Smith TL, Keating MJ, Barlogie B, McCredie KB, et al. Identification of Risk Groups for Development of Central Nervous System Leukemia in Adults With Acute Lymphocytic Leukemia [Internet]. Vol. 72, *Blood*. 1988. Available from: www.bloodjournal.org
 39. Gacha Garay MJ, Akle V, Enciso L, Garavito Aguilar ZV. La leucemia linfoblástica aguda y modelos animales alternativos para su estudio en Colombia. *Rev Colomb Cancerol*. 2017 Oct;21(4):212–24.
 40. Guía de práctica clínica para la detección, tratamiento y seguimiento de leucemias linfoblástica y mieloide en población mayor de 18 años. Ministerio de protección social. Colombia 2017;1-1082
 41. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012 Jan 12;481(7380):157–63.
 42. Ramirez WO. Information and Childhood Cancer. *Colomb Med (Cali)*. 2015; 47 (2): 74-5

43. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;
44. Pui C-H, Relling M V, Downing JR. Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. Vol. 350, *N Engl J Med.* 2004. Available from: www.nejm.org
45. Fièrè D, Lepage E, Sebban C, Boucheix C, Gisselbrecht C, Vernant JP, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: a multicentric randomized trial testing bone marrow transplantation as postremission therapy. The French Group on Therapy for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017 Feb 23;11(10):1990–2001.
46. Aldoss I, Al Malki MM, Stiller T, Cao T, Sanchez JF, Palmer J, et al. Implications and Management of Central Nervous System Involvement before Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;
47. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Vol. 101, *Haematologica.* Ferrata Storti Foundation; 2016. p. 407–16.
48. Sunil SK, Prakash PN, Hariharan S, Vinod G, Preethi RT, Geetha N, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia with near haploidy, hyperdiploidy and Ph positive lines: A rare entity with poor prognosis. *Leuk Lymphoma.* 2006 Mar;47(3):561–3.
49. Bain BJ. Leukaemia Diagnosis. *Leukaemia Diagnosis.* Wiley; 2010.
50. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Vol. 127, *Blood.* American Society of Hematology; 2016. p. 2391–405.
51. Richards S, Pui CH, Gayon P. Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood and Cancer.* 2013.
52. Abdi N, Zaj P, Rostaminezhad A, Behnammoghadam M, Rahmani F. Advances in Environmental Biology Management and treatment in acute lymphoblastic leukemia: A review article [Internet]. Vol. 8, *Advances in Environmental Biology.* 2014. Available from: <http://www.aensiweb.com/aeb.html>
53. Gabelli M, Disarò S, Scarparo P, Francescato S, Zangrando A, Valsecchi MG, et al. Cerebrospinal fluid analysis by 8-color flow cytometry in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma.* Taylor and Francis Ltd; 2019.
54. Therrien J, Cantelli G, Olivere L, Yao H, McCall CM, Price TT, et al. Leukaemia hijacks a neural mechanism to invade the central nervous system. *Nature.* 2018;
55. Williams MTS, Yousafzai YM, Elder A, Rehe K, Bomken S, Frishman-Levy L, et al. Regular Article LYMPHOID NEOPLASIA. *Blood* [Internet]. 2016;127(16):1998–2006. Available from: www.sciencellonline.com/site/ethics.php
56. Münch V, Trentin L, Herzig J, Demir S, Seyfried F, Kraus JM, et al. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia is mediated by vascular endothelial growth factor. *Blood.* 2017;
57. Craig MD, O’Leary HA, Akers SM, Vos JA, Minnear FL, Gibson LF, et al. VE-cadherin and PECAM-1 enhance ALL migration across brain microvascular endothelial cell

- monolayers. *Exp Hematol*. 2010;
58. Torres X, Campos A, Romero M, Uribe AM, Reyes ID los, Cuellar G, et al. Análisis de la utilidad de la citometría de flujo en la identificación de infiltración neoplásica del líquido cefalorraquídeo en pacientes con leucemia aguda y su asociación con parámetros clínico-biológicos de importancia pronóstica. *Rev Colomb Cancerol*. 2017;
 59. Castro Jiménez MÁ, Carlos L, Vargas O, Arenas ER, Mattos AS, De Revisión A. Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda en pediatría: incidencia, mortalidad y asociaciones causales. 2005.
 60. Pui CH, Thiel E. Central Nervous System Disease in Hematologic Malignancies: Historical Perspective and Practical Applications. *Semin Oncol*. 2009;
 61. Zeiser R, Burger JA, Bley TA, Windfuhr-Blum M, Schulte-Mönting J, Behringer DM. Clinical follow-up indicates differential accuracy of magnetic resonance imaging and immunocytology of the cerebral spinal fluid for the diagnosis of neoplastic meningitis - A single centre experience. *Br J Haematol*. 2004 Mar;124(6):762–8.
 62. Cancela CSP, de Macedo AV, De Oliveira BM, Viana MB, Souza ME de L, Assumpção JG, et al. Immunophenotyping of the cerebrospinal fluid as a prognostic factor at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents. *Pediatr Hematol Oncol*. 2017;
 63. Rahimi J, Woehrer A. Overview of cerebrospinal fluid cytology. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 563–71.
 64. De Graaf MT, De Jongste AHC, Kraan J, Boonstra JG, Smitt PAES, Gratama JW. Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*. 2011.
 65. Jaime-Pérez JC, Borrego-López MF, Jiménez-Castillo RA, Méndez-Ramírez N, Salazar-Riojas R, Fernández LT, et al. Comparison of conventional cytomorphology, flow cytometry immunophenotyping, and automated cell counting of CSF for detection of CNS involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2018 Apr 1;40(2):169–74.
 66. Levinsen M, Marquart H V., Groth-Pedersen L, Abrahamsson J, Albertsen BK, Andersen MK, et al. Leukemic blasts are present at low levels in spinal fluid in one-third of childhood acute lymphoblastic leukemia cases. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;
 67. De Santis G, Sconocchia G, Di Piazza F, Maurillo L, Sarlo C, Amadori S, et al. High sensitivity of flow cytometry improves detection of occult leptomeningeal disease in acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Ann Hematol*. 2014;
 68. Moscardó C, Martínez-Laperche C, Couselo JM, Fuster JL, Molina J, Bureo E, et al. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am J Hematol*. 2013;
 69. Vaz A da C, Bacal NS, Nosawa ST, Barroso R de S, Duarte CAS, Fernandes GBP, et al. Detection of Central Nervous System Infiltration by Myeloid and Lymphoid Hematologic Neoplasms Using Flow Cytometry Analysis: Diagnostic Accuracy

- Study. *Front Med*. 2018;
70. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, Kühl J, Löning L, Riehm H, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: Significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol*. 2003;
 71. Popov A, Henze G, Verzhbitskaya T, Roumiantseva J, Lagoyko S, Khlebnikova O, et al. Absolute count of leukemic blasts in cerebrospinal fluid as detected by flow cytometry is a relevant prognostic factor in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;
 72. Gaudichon J, Jakobczyk H, Debaize L, Cousin E, Galibert MD, Troadec MB, et al. Mechanisms of extramedullary relapse in acute lymphoblastic leukemia: Reconciling biological concepts and clinical issues. *Blood Reviews*. Churchill Livingstone; 2019.
 73. Ranta S, Nilsson F, Harila-Saari A, Saft L, Tani E, Söderhäll S, et al. Detection of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia by cytomorphology and flow cytometry of the cerebrospinal fluid. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;
 74. Larson RA, Dodge RK, Burns CP, Lee EJ, Stone RM, Schulman P et al. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood* 1995; 85: 2025–2037.
 75. Subirá Dolores, C.S., Aceituno Esther, Hernández Jaime, Jiménez-Garófano Carmen, Jiménez Antonio, Jiménez Ana Maria, Román Alejandro and Orfao Alberto, Flow Cytometric Analysis of Cerebrospinal Fluid Samples and Its Usefulness in Routine Clinical Practice. *Anatomic Pathology*, 2002. **117**: p. 952-958.